

**TERAPI SALEP EKSTRAK KITOSAN CANGKANG
RAJUNGAN (*Portunus pelagicus*) TERHADAP
EKSPRESI HIF-1 DAN PROTEIN HSP90
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
DIINDUKSI LUKA BAKAR**

SKRIPSI

Oleh :

**ANNISA WIDOWATI
145130101111057**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**TERAPI SALEP EKSTRAK KITOSAN CANGKANG
RAJUNGAN (*Portunus pelagicus*) TERHADAP
EKSPRESI HIF-1 DAN PROTEIN HSP90
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
DIINDUKSI LUKA BAKAR**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**ANNISA WIDOWATI
145130101111057**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Terapi Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)
terhadap Ekspresi HIF-1 dan Protein Hsp90 pada Tikus
(*Rattus norvegicus*) Diinduksi Luka Bakar**

Oleh:

ANNISA WIDOWATI
145130101111057

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 24 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Wibi Riawan, S. Si., M.Sc
NIP. 19770131 200501 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Annisa Widowati

NIM : 145130101111057

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Terapi Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus Pelagicus*)
Terhadap Ekspresi Hif-1 Dan Protein Hsp90 Pada Tikus (*Rattus*
Norvegicus) Diinduksi Luka Bakar

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemukakan hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Juli 2018

Yang menyatakan,

(Annisa Widowati)
NIM. 145130101111057

**TERAPI SALEP EKSTRAK KITOSAN CANGKANG RAJUNGAN
(*Portunus pelagicus*) TERHADAP EKSPRESI HIF-1 DAN PROTEIN
HSP90 PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
DIINDUKSI LUKA BAKAR**

ABSTRAK

Luka bakar adalah kerusakan jaringan kulit akibat terpapar sumber panas yang mengakibatkan respon hipoksia. Pemanfaatan bahan alam seperti limbah Kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) yang berperan penting dalam modulasi angiogenesis, mengaktivasi sel-sel inflamasi, menginduksi faktor pertumbuhan salah satunya yaitu VEGF sehingga dapat digunakan sebagai alternatif terapi luka bakar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh salep kitosan asal cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dapat menurunkan ekspresi protein HIF-1 dan Hsp90 pada tikus yang diinduksi luka bakar derajat II dalam. Hewan coba menggunakan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan berat 150-200 gram dan umur 8-12 minggu. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tikus dibagi dalam 2 perlakuan yang terdiri dari 6 kelompok yaitu perlakuan kontrol menggunakan salep bioplacenton dan perlakuan terapi menggunakan salep kitosan konsentrasi 5% selama 7 hari dengan pemberian 2 kali sehari. Ekspresi protein Hsp90 dan HIF-1 diamati menggunakan metode imunohistokimia (IHK) pada hari ke-1, ke-3 dan hari ke-7, kemudian hasil data dihitung dengan software *image raster* dan dianalisa secara kuantitatif menggunakan Microsoft Excel dan SPSS for windows dengan analisis statistika ragam One Way ANOVA Faktorial (*General linear*) dan dilanjutkan dengan uji Tukey ($\alpha = 0.05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kitosan pada hari ke-3 dan ke-7 berturut-turut menurunkan ekspresi protein Hsp90 sebesar 35,6% dan 30% serta ekspresi protein HIF-1 sebesar 39% dan 38%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah salep ekstrak kitosan dapat digunakan sebagai alternatif terapi luka bakar.

Kata Kunci : Luka bakar, HIF-1 , Hsp90, Kitosan, *glycoaminoglican*

**THERAPY CHITOSAN OINTMENT EXTRACT OF CRAB'S SHELL
(*Portunus pelagicus*) TOWARD HIF-1 EXPRESSION AND HSP90
PROTEIN ON RATS (*Rattus norvegicus*) INDUCED BY BURN**

ABSTRACT

Scorches are damaged skin tissue due to heat exposure resulting some of hypoxic responses. Chitosan waste of Crab's shell (*Portunus pelagicus*) which plays an important role in angiogenesis modulation. It activates inflammatory cells which included as growth factor, such as VEGF as well so can be used as an alternative therapy of scorches. This study aimed to determine the effect of chitosan ointment from crab's shell (*Portunus pelagicus*) in decreasing expression of HIF-1 and Hsp90 protein in rat induced by second degree scorches. This experiment using male white rats (*Rattus norvegicus*) with weight in range between 150-200 grams and age of 8-12 weeks. This research using is Rancangan Acak Kelompok (RAK) with 2 treatments groups of rats consist of 6 groups, namely kontrol groups of bioplacenton and therapy groups of chitosan concentration 5% for 7 days, 2 times a day. The observations of Hsp90 protein and HIF-1 expression were performed using immunohistochemical method (IHK) on the first, third and seventh days. Collected data are calculated with *image raster* software and analyzed quantitatively using Microsoft Excel and SPSS for windows Program applying One Way ANOVA Factorial (*General linear*) analysis continued with Tukey test ($\alpha=0.05$). The result showed that the extract of chitosan shell crab (*Portunus pelagicus*) could decrease expression of Hsp90 on days 3 and 7 with average 35,6% and 38%, and expression of HIF-1 protein with average 39% and 38%. The conclusion of this research is that chitosan 5% can be used as an alternative therapy of burn.

Keywords: Scorches, HIF-1, Hsp90, Chitosan, *glycoaminoglican*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat Rahmat dan Anugrah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi ini. Skripsi yang berjudul “Terapi Pemberian Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap Ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF-1) Dan Protein Hsp90 pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Bakar”.

Ketertarikan penulis mengangkat topik ini karena pemanfaatan kitosan dari limbah cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) sebagai alternatif luka bakar ditinjau dari ekspresi HIF-1 dan Hsp90 masih belum diteliti. Penelitian ini merupakan payung dari penelitian yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES. Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku dosen pembimbing I serta Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Bapak Wibi Riawan, S. Si., M.Sc. selaku dosen pembimbing II serta dosen Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. drh. Ahmad Fauzi, M.Sc selaku penguji I dan Dhita Evi Aryani, S.Fram, Apt. selaku penguji II yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan serta arahan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.

3. Ayah dan Ibu serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih sayang, dan dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.
4. Terimakasih kepada seluruh staf dan asisten Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian. Serta Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
5. Teman-teman Kitosan lima serangkai yang telah berjuang bersama dalam penelitian ini dan teman-teman 2014 yang selalu memberikan dorongan, semangat, inspirasi dan keceriaan.
6. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Mengingat keterbatasan dan kemampuan yang dimiliki, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat berterimakasih atas saran dan kritik serta arahan yang diberikan oleh semua pihak untuk penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis menyampaikan mohon maaf apabila terdapat kesalahan dalam penulisan skripsi ini.

Malang.....

Annisa Widowati

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kulit.....	5
2.2 Luka.....	7
2.2.1 Luka bakar.....	8
2.2.2 Klasifikasi luka bakar.....	8
2.3 Penyembuhan Luka.....	10
a. Fase Haemostasis.....	10
b. Fase Inflamasi.....	11
c. Fase Proliferasi.....	11
d. Fase Pematangan.....	12
2.4 Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>).....	12
2.5 Kitosan.....	14
2.6 Hewan Percobaan Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	16
2.7 HIF-1.....	18
2.8 Hsp90.....	19
2.9 Imunohistokimia.....	20
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual.....	21
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	27
4.3 Tahapan Penelitian.....	28
1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.....	28
2. Prosedur sintesis kitosan.....	28
3. Pembuatan luka bakar pada tikus.....	28
4. Terapi salep kitosan.....	28
5. Pengambilan sampel kulit dan pembuatan preparat.....	28
6. Perhitungan ekspresi HIF-1 dan Hsp90 dengan	

imunohistokimia	28
7. Analisa Data.....	28
4.3.1 Rancangan Penelitian	28
4.3.2 Penetapan sampel Penelitian	29
4.3.3 Variabel Penelitian.....	30
4.4 Prosedur Kerja	30
4.4.1 Persiapan hewan coba	30
4.4.2 Prosedur sintesis kitosan cangkang rajungan	31
4.4.3 Pembuatan salep kitosan	33
4.4.4 Perlakuan luka bakar pada tikus	33
4.4.5 Terapi salep kitosan	34
4.4.6 Euthanasi dan Isolasi jaringan kulit	34
4.4.7 Prosedur imunohistokimia dan perhitungan ekspresi HIF-1 dan Hsp90	35
4.5 Analisa data	35
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Gambaran makroskopis tikus.....	36
5.2 Penurunan ekspresi protein Hsp90 pada tikus yang diinduksi luka bakar derajat II dengan terapi salep ekstrak kitosan dibandingkan dengan kontrol bioplacenton.....	38
5.3 Penurunan ekspresi protein HIF-1 pada tikus yang diinduksi luka bakar derajat II dengan terapi salep ekstrak kitosan dibandingkan dengan kontrol bioplacenton.....	45
BAB 6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan.....	53
6.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	61

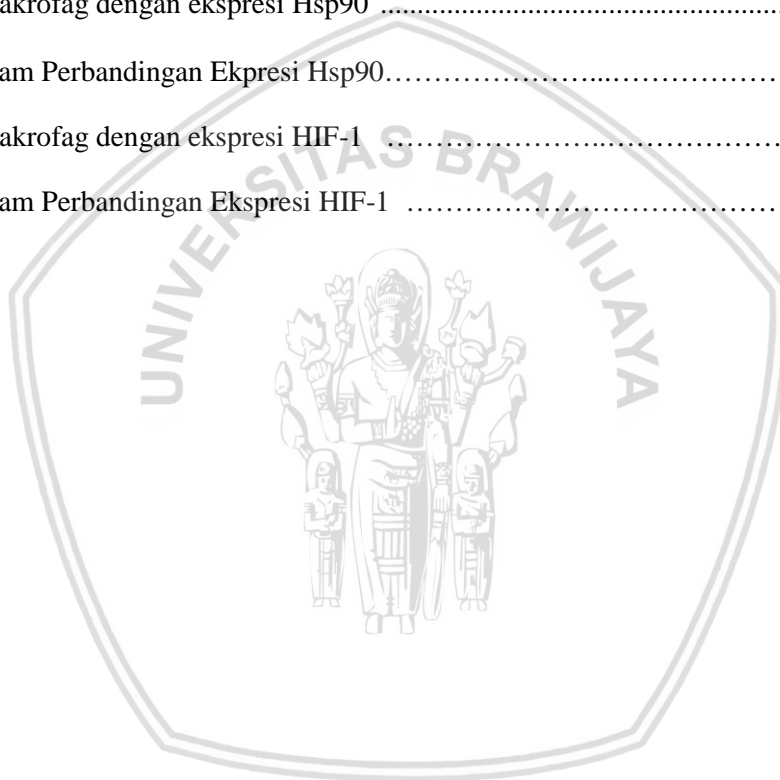
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.5 Mutu Kitosan cangkang Rajungan	16
5.2 Tabel ekspresi <i>Heat Shock Protein</i> (Hsp90).....	40
5.4 Tabel ekspresi <i>Hypoxia Inducible Factor</i> (HIF-1).....	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Histopatologi Kulit	7
2.2 Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>).....	13
2.3 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	16
5.1 Gambaran makroskopis jaringan kulit tikus.....	36
5.2 Sel makrofag dengan ekspresi Hsp90	38
5.3 Diagram Perbandingan Ekspresi Hsp90.....	40
5.4 Sel makrofag dengan ekspresi HIF-1	45
5.5 Diagram Perbandingan Ekspresi HIF-1	47



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: Persen
ANOVA	: One Way Analysis of Variance
BB	: Berat Badan
BNJ	: Beda Nyata Jujur
CaCO ₃	: Kalsium karbonat
Cc	: Cubic centimeter
cm	: Centimeter
COX-2	: <i>Siklooksigenase 2</i>
DNA	: <i>Deoksiribonukleat</i>
eNOS	: <i>Nitric-oxide syntase</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast growth factor</i>
FTIR	: Fourier Transform Infra Red
g	: Gram
GAG	: <i>Glicoaminoglican</i>
GLUT 2	: <i>Glucose Transporter</i>
HCL	: Hidrogen klorida
HER2	: <i>Human epidermal growth factor reseptor 2)</i>
HIF-1	: <i>Hypoxia inducible factor 1 alfa</i>
Hsp90	: <i>Heat Shock Protein 90</i>
IHK	: Imunohistokimia
IL-4	: <i>Interleukin 4</i>
KBr	: <i>Kalium bromide</i>
kg	: kilogram
mg	: Miligram
MgCO ₃	: <i>Magnesium karbonat</i>
mL	: Mililiter
mm	: Milimeter
NaOCl	: <i>Natrium hipoklorit</i>
NaOH	: <i>Natrium hidroksida</i>
NO	: <i>Nitrogen oksidase</i>
O ₂	: Oksigen
°C	: Derajat celcius
PAF	: <i>Platelet activating factor</i>
PGE ₂	: <i>Prostaglandin E2</i>
pH	: Potensial of Hidrogen
PMN	: <i>polimorfonuklear</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Pada era modern saat ini pemeliharaan dari hewan kesayangan terutama anjing dan kucing meningkat dengan pesat. Tidak sedikit pula pemilik hewan kesayangan menganggap hewan peliharaannya sebagai anggota keluarganya sendiri. Hal ini menunjukkan bahwa hewan peliharaan telah memiliki posisi yang baik dalam kehidupan manusia. Oleh karena hal itu pemilik hewan harus memperhatikan dari kesehatan dan kebersihan hewan peliharaannya sendiri. Saat ini tidak sedikit pemilik hewan memperhatikan dari kesehatan hewan peliharaannya. Perawatan dan pemeliharaan hewan yang baik akan menghindari hewan peliharaan dari penyakit. Sama halnya dengan manusia pemilik hewan biasanya akan menghindarkan hewan peliharaannya dari benda-benda tajam, kontak dengan sumber panas seperti bahan kimia, api, air panas, listrik dan radiasi untuk menghindari terjadinya perlukaan pada hewan peliharaan, karena hewan peliharaan mudah sekali terluka karena kulitnya yang sensitif.

Luka bakar merupakan suatu bentuk kerusakan pada kulit atau jaringan organik lain yang utamanya disebabkan oleh panas atau trauma akut. Luka bakar sangat unik karena luka tersebut meliputi sejumlah besar jaringan mati (eskar) yang tetap berada pada tempatnya untuk jangka waktu yang lama. Penyebab terjadinya luka bakar antara lain adalah kontak dengan sumber panas seperti air panas, api, bahan kimia, listrik dan radiasi (Peck, 2012). Luka bakar dapat menimbulkan efek lokal dan sistemik. Efek lokal dari luka bakar adalah kemerahan, bengkak, nyeri dan perubahan sensasi rasa (Rudall dan Green, 2010).

Penyebab terjadinya efek lokal salah satunya adalah nekrosis epidermis dan jaringan. Luka bakar dapat mempengaruhi semua sistem jaringan dan besarnya respon patofisiologis erat kaitannya dengan luas luka bakar, kulit merupakan barier alami tubuh terhadap infeksi sehingga jika terjadi luka maka proteksi tubuh akan hilang dan sehingga akan terjadi respon inflamasi (Susane *et al.*, 2001).

Keadaan luka akan menyebabkan hipoksia fisiologis yang memicu stress oksidasi yang dapat mempengaruhi ekspresi dari transkripsi gen. Stress oksidasi mengaktivasi terbentuknya protein stress seperti *Heat shock protein* (Hsp90). Hsp90 berperan dalam meregulasi protein transkripsi seperti, HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*) yang merupakan subunit faktor transkripsi sel pada kondisi hipoksia (Malhotra *et al.*, 2001) HIF-1 juga dapat menginduksi faktor transkripsi seperti angiogenesis yang berperan dalam fase proliferasi sehingga meningkatkan penyembuhan luka (Katschinski *et al.*, 2004).

Di Indonesia sendiri obat-obatan untuk hewan terkhusus luka bakar masih sangat kurang. Walaupun ada tetapi tidak sedikit pula yang memiliki efek samping dari pemakaiannya. Oleh karena hal tersebut pemanfaatan sumber dari alam yaitu, kitosan dari ekstrak limbah cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) sebagai terapi luka bakar dapat diperhitungkan. Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari khitin. Kitosan memiliki kandungan *glycoaminoglican* (GAG). Kandungan GAG berperan penting dalam modulasi angiogenesis. Pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi. Terapi yang akan dilakukan pada penelitian ini dengan kitosan akan berupa salep yang dioleskan pada kulit. Salep

berbahan dasar lemak akan menjaga kulit tetap lembab dan menghindari mikroorganisme untuk tumbuh serta salep mudah diserap oleh kulit (Yanhendri, 2012). Dengan sifat-sifat tersebut diharapkan salep kitosan dapat mempercepat penyembuhan luka dan mencegah terjadinya infeksi sekunder pada luka.

Berdasarkan tinjauan tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan studi terapi kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap tikus putih yang diinduksi luka bakar. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*) dan Hsp90 (*Heat shock protein 90*). Penelitian ini diharapkan dapat membuat inovasi baru mengenai pengobatan luka bakar dan menambah literatur dari pemanfaatan kitosan untuk penyembuhan luka.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dosis 5% berpengaruh terhadap ekspresi HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*) pada tikus yang diinduksi luka bakar ?
2. Apakah pemberian salep kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dosis 5% berpengaruh terhadap ekspresi protein Hsp90 (*Heat shock protein 90*) pada tikus yang diinduksi luka bakar ?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 8-12 minggu dengan berat badan berkisar 150-200 g. Penggunaan hewan coba sudah dilakukan pengajuan laik etik dengan No: 943-KEP-UB (**Lampiran 10**) dari Laboratorium Biosains Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. Induksi luka bakar dengan cara kontak langsung antara kulit dengan agen termal (plat besi yang dipanaskan 10 menit pada air mendidih).
3. Rajungan yang digunakan adalah jenis rajungan (*Portunus pelagicus*) yang didapat dari pabrik produksi limbah rajungan di Madura
4. Bentuk sediaan obat salep kitosan dengan konsentrasi 5% diberikan 2 kali dalam sehari (Fitri dkk, 2012). Serta penggunaan salep gold standar bioplacenton sebagai kontrol positif.
5. Pengamatan dan Pengukuran ekspresi HIF-1 dan protein Hsp90 dilakukan dengan menggunakan metode imunohistokimia

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar terhadap penurunan ekspresi dari HIF-1 .
2. Mengetahui pengaruh salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar terhadap penurunan ekspresi protein Hsp90.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi dan mengetahui potensi mengenai terapi salep kitosan dari limbah cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) sebagai alternatif penyembuhan luka bakar terhadap ekspresi HIF-1 dan protein Hsp90. Selain itu memberi nilai tambah pada limbah cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) untuk lebih dimanfaatkan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

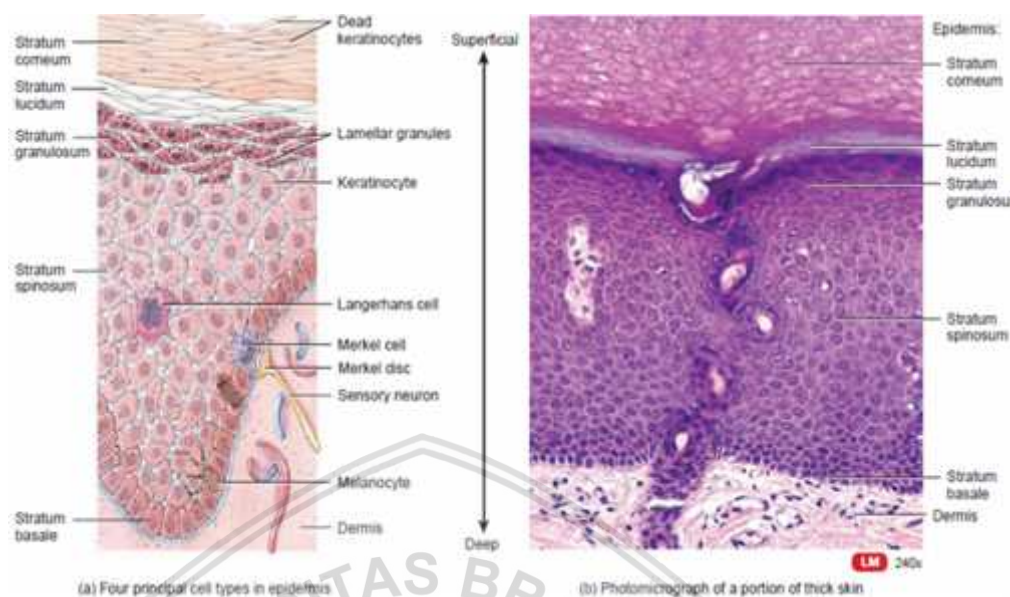
2.1 Kulit

Kulit merupakan organ terbesar dari tubuh dan memiliki fungsi sebagai garis pertama dari pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme. Kulit berperan sebagai reseptor sensorik untuk sentuhan, tekanan, getaran, nyeri, panas dan dingin serta beberapa fungsi lainnya seperti produksi vitamin D, penyimpanan air, lemak, elektrolit, karbohidrat dan protein, penghalang dari bahan kimia dan radiasi serta isolator pada lemak subkutan. Kulit tersusun atas jaringan dasar yaitu lapisan epitel berlapis gepeng dengan tanduk, beberapa jenis jaringan ikat, jaringan otot serta jaringan saraf sebagai reseptor sensoris. Kulit terdiri dari lapisan utama yakni epidermis dan dermis (Pavletic, 2010). Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ectoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat agak padat dari mesoderm. Lapisan dermis di bawahnya ada selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis yang terdiri dari jaringan lemak (Mescher, 2010).

Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit yang terdiri atas epitel berlapis gepeng yang tersusun banyak lapisan sel disebut keratinosit dengan lapisan tanduk. Pada jaringan ini tidak mempunyai pembuluh darah maupun limfe, oleh karena itu semua nutrisi dan oksigen diperoleh dari kapiler lapisan dermis. Setiap sel di lapisan ini diperbarui melalui mitosis sel-sel dalam lapisan basal yang secara berangsur menuju permukaan epitel. Selama prosesnya sel akan berdiferensiasi, membesar dan mengumpulkan filament keratin dalam sitoplasma. Sel-sel yang mati akan terkelupas dan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai permukaan adalah 20 sampai 30 hari. Epidermis terdiri atas lapisan-lapisan. Ada 5

lapisan-lapisan dari dalam keluar yaitu, paling atas ada *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lusidum* dan *stratum korneum* (Mescher, 2010).

Dermis tersusun atas *stratum papilaris* dan *stratum retikularis*, serta terbentuk dari jaringan yang kaya kolagen dan sel elastis yang membuat kulit menjadi kuat dan elastis, batas antara kedua lapisan tidak tegas, serat antaranya saling menjalin. Stratum papilaris tersusun dari papilla dermis yang jumlahnya bervariasi antara 50-250/mm². Jumlah terbanyak biasa pada daerah tekanan paling besar seperti telapak kaki. Jumlah sel dalam dermis relatif sedikit dan sel-sel dermis merupakan sel jaringan ikat seperti fibroblast, sel lemak, sedikit makrofag dan sel mast. Sebagian besar papilla mengandung pembuluh kapiler yang memberi nutrisi pada epitel di atasnya. Papilla lainnya mengandung *badan Meissner* dan tepat di bawah epidermis serat-serat kolagen tersusun rapat. Lapisan paling atas dari dermis tersusun atas jaringan ikat, jaringan elastis, pembuluh darah dan pembuluh limfatik. Berkas-berkas kolagen dan sejumlah kecil serat elastin membentuk jalinan padat ireguler (Mescher, 2010). Bagian dalam dari dermis terdiri atas lapisan retikuler yang membuat menjadi tebal dan mengandung jaringan kolagen yang membantu penyebaran serabut elastis, pembuluh darah, pembuluh limfatik dan *Adnexa*. *Adnexa* mengandung jaringan lemak, kelenjar keringat, kelenjar sebacea, kelenjar apokrin serta folikel rambut. Pada *Adnexa* terdapat struktur khusus yang berasal dari lapisan epidermis yang termasuk bagian penting dari dermis tetapi dalam situasi tertentu dapat meluap ke subkutis



Gambar 2.1 Histologi Kulit (Vasudeva and Mishra, 2014)

2.2 Luka

Luka adalah kerusakan fisik sebagai akibat dari terbukanya kulit dan menyebabkan ketidak seimbangan fungsi dan anatomi kulit normal. Luka juga dapat mengganggu seluler, anatomi dan fungsi jaringan hidup yang disebabkan trauma fisik, kimia, suhu, mikroba atau imunologi. Luka adalah kerusakan dari integritas epitel kulit diikuti dengan ketidakseimbangan struktur dan fungsi jaringan normal akibat dari luka memar, luka lebam, luka robek, luka lecet dan luka bakar (Drosou *et al.*, 2003). Jenis-jenis luka menurut Abdurrahmat (2014) dapat dikategorikan menjadi dua jenis yaitu, luka terbuka serta luka tertutup. Luka terbuka diklasifikasikan berdasarkan objek penyebabnya antara lain : luka insisi, luka laserasi, luka abrasi, luka tusuk, luka penetrasi dan luka tembak. Luka tertutup dibagi atas tiga, yaitu : kontusi, hematoma dan luka tekan. Selain itu ada beberapa jenis luka lain seperti luka bakar, luka akibat sengatan listrik, luka akibat zat kimia, cedera suhu dingin, luka akibat radiasi, luka ionisasi, luka terkoyak, luka bocor, luka gores, kemudian ada juga luka gigitan.

2.2.1 Luka Bakar

Luka bakar dalam istilah disebut dengan *combustion injury* atau *burn injury* adalah rusaknya sebagian dari jaringan yang disebabkan karena beberapa faktor seperti perubahan suhu tinggi, sengatan listrik, ledakan maupun kontak langsung dengan bahan kimia (Moenadjat, 2003). Luka bakar dapat terjadi pada bagian seperti kulit, selaput lendir, saluran pernafasan dan saluran pencernaan. Luka bakar dapat mengakibatkan rasa sakit, bengkak, merah, kadang disertai sensai melepuh. Kerusakan pada jaringan kulit menyebabkan lapisan epidermis, dermis dan subkutan terganggu keseimbangannya. Kedalaman luka bakar ditentukan oleh tingginya suhu dan lamanya paparan pada kulit. Jenis luka ini dibedakan menjadi luka bakar ketebalan parsial yaitu bila yang terbakar hanya sampai pada jaringan epidermis sedangkan jaringan dermis tetap utuh dan tingkatan di atasnya ialah luka bakar total dimana sebagian dermis ikut terbakar sehingga lebih banyak cairan dan protein tubuh yang hilang (Abdurrahmat, 2014).

2.2.2 Klasifikasi Luka Bakar

Klasifikasi luka bakar bisa didasarkan pada tingkat kedalaman suatu luka yang akan ditimbulkan. Kedalaman dari luka bakar dapat ditentukan oleh seberapa tinggi suatu suhu yang menyebabkan cedera, lamanya waktu paparan agen termal, serta tingkat ketebalan suatu kulit (Kasten *et al.*, 2011).

Derajat I (*Superficial*), Luka bakar tipe derajat I terjadi di permukaan kulit, meliputi bagian epidermis. Manifestasi luka bakar yaitu, kulit kemerahan disertai nyeri dan dapat terlihat adanya bulla. Luka bakar derajat 1 dapat disebabkan oleh kontak dengan waktu singkat dengan agen termal. Luka ini dapat sembuh dalam 3 hingga 7 hari dan tidak ada jaringan parut saat remodeling (Rizzo, 2001).

Derajat II (*Partial thickness*), luka bakar derajat II terjadi di semua bagian epidermis dan sebagian lagi di lapisan dermis. Manifestasi luka ini yaitu, kulit tampak kemerahan, terdapat bulla, terjadi edema, dan nyeri berat. Luka bakar ini disebabkan adanya kontak dengan agen termal, seperti tersiram air panas. Luka bakar derajat II dibedakan lagi menjadi luka bakar derajat II *superfisial parsial* atau dangkal dan luka bakar derajat II *deep parsial* atau dalam (Muscari, 2005).

Luka bakar derajat II dangkal (*Superfisial parsial*), manifestasi dari luka bakar tipe ini yaitu, permukaan yang kulit lembab, warna kulit merah memucat, terdapat selain itu edema dan lepuhan berisi cairan, dan nyeri. Luka bakar ini sembuh dalam waktu kurang lebih 2 minggu tanpa jaringan parut (Muscari, 2005).

Luka bakar derajat II dalam (*Deep parsial*), manifestasi dari luka bakar tipe ini yaitu, permukaan kulit kering, warna kulit putih cerah, terdapat edema, dan lepuhan berbentuk seperti kertas tisu yang rata dan kering dan nyeri sedang hingga berat apabila terjadi kontak dengan air ataupun udara. Luka sembuh dalam waktu beberapa bulan dengan disertai jaringan parut (Muscari, 2005).

Derajat III (*Full thickness*), terjadi pada seluruh lapisan kulit termasuk tendon, syaraf, dan jaringan otot. Kulit akan tampak kering dan mungkin ditemukan bulla berdinding tipis, dengan tampilan luka yang beragam dari warna putih, merah terang hingga tampak berwarna hitam seperti arang. Dapat disebabkan oleh kontak langsung dengan api. Nyeri yang dirasakan terbatas akibat hancurnya ujung saraf pada dermis. Penyembuhan luka yang terjadi dapat sangat lambat, serta biasanya terbentuk jaringan parut dan juga biasanya membutuhkan donor kulit (*skin grafting*) (Barbara *et al.*, 2013).

2.3 Penyembuhan luka

Penyembuhan luka adalah suatu proses dinamik kompleks yang menghasilkan pemulihan terhadap kontinuitas anatomik dan fungsi jaringan setelah terjadi perlukaan. Proses penyembuhan luka didukung oleh fibroblast terkhusus pada jaringan kulit. Fibroblast merupakan sel yang bertanggung jawab mensintesis kolagen. Kolagen sangat dibutuhkan untuk penyembuhan luka (Lorentz *et al.*, 2006). Ada beberapa fase dalam penyembuhan luka, fase-fase tersebut meliputi :

a. Fase Haemostasis

Luka dapat menyebabkan perdarahan sehingga secara normal tubuh akan merespon untuk menghentikan perdarahan. Respon tersebut meliputi terjadinya kontraksi otot polos dinding pembuluh darah yang akan mengurangi aliran darah. Hal tersebut dimediasi oleh penyempitan arteriol akibat dari agregasi platelet yang menyebabkan hipoksis jaringan dan asidosis. Hal itu akan meningkatkan produksi oksida nitrat, adenosine, dan metabolit vasoaktif yang menyebabkan vasodilatasi dan relaksasi pembuluh arteri, secara bersamaan histamin akan keluar dari sel mast untuk meningkatkan vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah, sehingga akan akan memfasilitasi sel inflamasi masuk ke ruang ekstraseluler luka. Dalam fase ini trombosit akan memiliki peran penting dalam proses pembekuan darah sehingga darah yang keluar akan berkurang (Hatz *et al.*, 2004). Proses ini berlangsung sangat cepat sekitar 5-10 menit (Mackay dan Miller, 2003).

b. Fase Inflamasi

Inflamasi merupakan reaksi vaskuler dan seluler terhadap luka . Fase ini berlangsung 4-6 hari (Broughton *et al.*, 2006). Reaksi awal yaitu vasodilatasi lokal, keluarnya darah dan cairan menuju pada ruangan ekstrasvaskular dan terhambatnya aliran limfatik. Hal tersebut menyebabkan timbulnya bengkak, merah dan panas. Peradangan adalah suatu reaksi dari luka yang menimbulkan vaskularisasi dari jaringan hidup. Perubahan dari vascular yaitu perubahan pergerakan laju arus darah dalam pembuluh, eksudasi, plasma darah, emigrasi sel leukosit, diapedesis dari sel eritrosit. Perubahan dari tingkat seluler meliputi peningkatan aktivitas leukosit yang terdiri dari marginasi, adesi, emigrasi, fagositosis dan pelepasan produk-produk leukosit ke jaringan ekstraseluler. Selain itu pada fase ini juga mengaktifkan dari beberapa mediator inflamasi seperti histamine, sel-sel lisosom, faktor pengaktifan platelet (PAF), sitokin. Pada fase ini akan terjadi perekrutan sel-sel radang yang menginfiltrasi luka seperti sel neutrophil, sel makrofag dan sel limfosit (Vegad, 2007).

c. Fase Proliferasi

Pada fase proliferasi atau fibroplasi ini aktifitas seluler yang lebih dominan. Tahap utama fase ini meliputi pembentukan permeabilitas (epitelisasi), kecukupan dari suplai darah (angiogenesis) dan juga pembentukan jaringan baru (fibroplasia) (Li *et al.*, 2007). Ciri-ciri fase proliferasi adalah angiogenesis, deposit kolagen, pembentukan jaringan granulasi, epitelisasi dan kontraksi luka. Fase ini dimulai hari ke 3 sampai ke 14 atau segera setelah fase inflamasi (Broughton *et al.*, 2006). Pada fase ini terjadi aktivitas mitosis sel-sel epidermis, sel endotel dan sel fibroblast. Sel-sel tersebut akan berkumpul memenuhi jaringan luka dan

membentuk jaringan granulasi yang terlihat merah muda dan bergranulasi. Pada fase ini mulai terjadi proses re-epitelisasi yang ditandainya sel-sel epitel mulai bermigrasi dan berproliferasi ke jaringan luka. Lapisan hemidesmosom antara epidermis dengan membran basal akan menipis dan memungkinkan sel epitel yang telah aktif untuk bermigrasi ke jaringan luka dan mengeluarkan sitokin.

d. Fase Pematangan

Fase remodeling ini dimulai hari ke 21 sampai 1 tahun. Pada fase remodeling ini melibatkan fibroblast dan miofibroblas untuk membentuk struktur jaringan. Pada fase ini kebutuhan akan metabolik luka, vaskuler menurun karena pengaruh dari growth factor matrik kolagen yang mengalami degradasi, resistensi, reorganisasi dan distabilkan oleh molekul crosslinking akan memunculkan scar. Fibroblas mulai mengilang dan terjadi pergantian tipe kolagen. Pada fase ini terjadi remodeling kolagen, kontraksi luka dan pematangan jaringan. Pada tahap ini banyak terdapat komponen matrik, hyaluronic acid, proteoglycan dan kolagen untuk perbaikan jaringan. Serabut kolagen meningkat menyebar serta saling menyatu dan berikatan untuk menyokong pemulihan jaringan (Suriadi, 2004).

2.3 Rajungan

Rajungan (**Gambar 2.3**) merupakan salah satu famili dari jenis kepiting. Suadela (2004) menyebutkan bahwa di Indo-Pasifik jenis kepiting dan rajungan diperkirakan ada 234 jenis, sedangkan Indonesia ada sekitar 124 jenis. Empat jenis rajungan diantaranya dapat dimakan yaitu jenis *Portunus pelagicus* (rajungan), *Portunus sanguinolentus* (rajungan bintang), *Charybdis feriatus* (rajungan karang) dan *Podophthalmus vigil* (rajungan angin).

Klasifikasi rajungan menurut Kangas (2000) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Arthropoda

Kelas : Crustacea

Subkelas : Malacostraca

Ordo : Decapoda

Famili : Portunidae

Genus : Portunus

Spesies : *Portunus pelagicus*

Nama local : Rajungan



Gambar 2.2 Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Rajungan hidup di perairan dangkal (mencapai 50 meter) dengan substrat berpasir lumpur. *Portunus pelagicus* banyak berada pada area perairan dekat karang, mangrove dan padang lamun. Rajungan ditangkap dalam jumlah besar dan beku di pasaran lokal. Morfologi *Portunus pelagicus* paling mirip dengan jenis *Portunus trituberculatus*. Namun, secara spesifik dapat dilihat dari jumlah duri frontal. Jenis *Portunus pelagicus* berjumlah empat dan berkarapas corak totol-totol, jantan berwarna biru sedangkan untuk rajungan betina hijau pudar.

Cangkang merupakan bagian terkeras dan terluar dari semua komponen rajungan. Selama ini pemanfaatan cangkang untuk pakan ternak atau pupuk organik mengingat kandungan mineral, terutama kandungan kalsiumnya cukup tinggi. Cangkang rajungan mengandung khitin, protein, CaCO_3 serta sedikit

MgCO₃ dan pigmen astaxanthin. Komposisi limbah cangkang rajungan beserta daging meliputi (Multazam, 2002) : air 4,32%, protein 18,18%, lemak 2,27%, serat kasar 16,67 %, abu 44,28%, karbohidrat 14,28%, mineral seperti fosfor 1,81%, kalsium 19,97%, magnesium 1,29%, tembaga (ppm) 30,62%, besi (ppm) 195,59%, seng (ppm) 44,59% dan mangan (ppm) 184,52%. Pada golongan krustase seperti rajungan umumnya mengandung senyawa seperti protein 30-40%, mineral (CaCO₃) 30-50% dan kitin 20-30% (Srijianto, 2003)

2.5 Kitosan

Kitosan merupakan polimer karbohidrat alami yang dapat ditemukan dalam kerangka krustasea, eksoskeleton zooplankton laut serta cangkang moluska. Sifat spesifik dari kitosan yaitu sifat bioaktif, biokompatibel, antibakteri, antijamur dan dapat terbiodegradasi (Ishihara *et al.*, 2002). Kitosan adalah hemostat yang dapat mengabsorpsi plasma, mengkoagulasi eritrosit dan aktivasi platelet. Kitosan dapat terdepolimerisasi menjadi *N-acetyl-D-glukosamin* yang memulai proliferasi fibroblast membantu dalam deposisi kolagen dan merangsang sintesis asam hyaluronic alami pada luka sehingga membantu penyembuhan luka dan mencegah bekas luka (Pillai *et al.*, 2009, Mizuno *et al.*, 2003).

Menurut penelitian Eldin *et al.*, (2008), menunjukkan bahwa hewan percobaan yang diberi kitosan memiliki resolusi neovaskularisasi yang lebih memadai, induksi fibroblas yang lebih cepat, dan serat kolagen yang lebih banyak. Kitosan memiliki empat fungsi yaitu dalam proses penyembuhan luka sebagai haemostasis dengan mempercepat proses pembekuan darah dengan menstimulasi faktor pembekuan darah seperti protrombin dan fibrinogen, sebagai antiinflamasi

dengan mengurangi produksi COX-2 yang menekan peningkatan ekspresi sitokin pro inflamasi secara berlebihan seperti IL-4 dan menghambat PGE2 sebagai mediator inflamasi, sebagai antimikroba dengan cara berikatan dengan dinding sel mikroba dan membran sitoplasma sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran dan kebocoran intraseluler mikroba, serta kitosan dapat menembus nucleus dari bakteri yang akan menghambat sintesis mRNA dan protein dengan cara berikatan dengan DNA mikroba dan terakhir kitosan dapat berperan dalam mempercepat fase proliferasi luka dengan mengaktifasi migrasi sel PMN, makrofag, dan memediasi fagositosis pada jaringan yang terluka sehingga mempercepat pembentukan jaringan baru (Ratnawati dkk, 2011).

Kitosan dengan rumus kimia yaitu poli-(2-amino-2-deoksi- -(1-4)-D-glukopiranos) merupakan senyawa poli aminosakarida yang disintesis melalui penghilangan sebagian gugus yaitu 2-asetil dari kitin [poli(2-asetamido-2-deoksi- -(1-4)-D-glukopiranos)], biopolimer linear 2000-5000 unit monomer, saling terikat dengan ikatan glikosidik -(1-4). Kitosan ($C_6H_{11}NO_4$) adalah senyawa yang berbentuk padatan amorf berwarna putih kekuningan, bersifat polielektrolit. Umumnya larut dalam asam organik, pH sekitar 4 sampai 6,5, tidak larut pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi. Kelarutan dipengaruhi oleh bobot molekul dan derajat deasetilasi. Kelarutan kitosan dalam asam asetat adalah salah satu parameter utama dalam standar penilaian mutu kitosan. Suatu penelitian menunjukkan, semakin tinggi kelarutan kitosan dalam asam asetat 2% menunjukkan mutu dari kitosan yang dihasilkan semakin baik (Rochima dkk, 2004). Kitosan yang dihasilkan memiliki kelarutan yang sempurna dalam asam

asetat 2%. Besar Kelarutan dari senyawa kitosan dapat diamati dengan membandingkan kejernihan larutan kitosan dengan kejernihan pelarutnya.

Tabel 2.5 Mutu Kitosan cangkang Rajungan

Parameter	Hasil penelitian	Standar kitosan *
Rendemen	12,58%	-
Bentuk partikel	Bubuk	bubuk
Kadar air	4,01%	$\leq 10\%$
Kadar abu	13,97%	$\leq 2\%$
Kadar nitrogen	1,37%	$\leq 5\%$
Derajat deasetilasi	76,16%	$\geq 70\%$

*) *Protan Laboratoriés (1987)*

Sumber: Loekman dkk, 2014

2.6 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus ini memiliki ciri rambut berwarna putih dan mata yang merah,

Klasifikasi tikus putih sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Odontoceti

Familia : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*



Gambar 2.3 Tikus putih (Potter, 2007)

Menurut Krinke (2000) terdapat beberapa galur tikus yang sering digunakan untuk penelitian, yaitu Wistar, Sprague-Dawley, Long Evans dan Holdzman. Pada penelitian ini digunakan galur Sprague-Dawley dengan ciri berwarna putih, kepala kecil dan ekor panjang. Keunggulan dari tikus putih adalah lebih cepat dewasa, tidak ada perkawinan musiman dan umumnya lebih cepat berkembang biak. Kelebihan sebagai hewan penelitian yaitu mudah ditangani, dapat ditinggal dalam kandang sendirian dan ukurannya cukup untuk pengamatan.

Berat badan hewan coba tikus putih umumnya lebih ringan dibandingkan tikus liar. Biasanya umur 4 minggu beratnya sekitar 35-40 g dan dewasa rata-rata 200-250 g, tetapi bervariasi tergantung galurnya. Tikus merupakan hewan mamalia oleh sebab itu perlakuan tidak jauh berbeda dengan mamalia lainnya. Kemampuan hidup tikus sekitar 2-3 tahun dengan lama produksi 1 tahun. Keadaan fisiologis normal tikus yaitu temperatur $35,9^{\circ}\text{C}$ - $37,5^{\circ}\text{C}$, pakan 5-6g sampai 100g/BB dan minum 10-12 mL/ 100g BB. Salah satu faktor yang mendukung kelangsungan hidup tikus putih adalah temperatur dan kelembaban. Temperatur yang baik untuk tikus putih yaitu 19°C – 23°C , sedangkan kelembaban berkisar antara 40 sampai 70 %.

Penelitian regenerasi jaringan kulit pada tikus berlangsung selama 4-12 hari dan telah dibuktikan pada hari ke-1 diameter luka (1 cm), hari ke-4 diameter luka (3 mm), hari ke-8 (2 mm) dan hari ke-21 (1 mm), terbukti bahwa regenerasi jaringan kulit tikus telah melalui fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi.

2.7 HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha*)

Hipoksia adalah suatu keadaan dimana konsentrasi oksigen dalam sel sangat rendah. Pada keadaan hipoksia, protein *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) berperan penting sebagai regulator hemostasis oksigen. HIF-1 adalah suatu activator transkripsi yang berperan dalam hemostasis oksigen untuk keberlangsungan hidup sel termasuk konsentrasi oksigen, metabolisme energi, status asam basa dan kontrol pertumbuhan dan perkembangan sel. HIF-1 terdiri atas ikatan dasar heliks-loop-heliks-PER-ARNT-SIM(PAS) yang dikelompokkan menjadi HIF-1 α dan HIF-1 β . Kedua jenis tersebut berperan sebagai aktivator hipoksia yang merespon terhadap gen eritropoietin. Selain itu HIF-1 berperan untuk meregulasi ekspresi gen *inducible form of nitrite oxide synthase* (iNOS), VEGF, *glucose transporter-1* dan beberapa enzim glikolitik. Adanya sinyal transduksi yang meningkat akan memicu aktivasi HIF-1 serta sel yang mengalami hipoksia akan mengekspresikan HIF-1. Sehingga regulasi HIF-1 berperan penting dalam sistem seluler, glikolisis, eritropoiesis, angiogenesis dan pembentukan vascular baru, selain itu HIF-1 juga berperan dalam respon imunologis, regulasi vaskularisasi dan metabolisme anaerob (Semenza, 2003).

HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik. Gen-gen yang diregulasi oleh HIF-1 di antaranya berhubungan dengan pengontrolan vasomotor (NOS2), angiogenesis (VEGF, FLT-1), pembentukan sel darah merah dan metabolisme besi (EPO, reseptor transferin, seruloplasmin), proliferasi sel (IGF-1, IGFBP-1, TGF β , FGF) dan metabolisme energi (GLUT 1-

3, fosfoenolpiruvat karboksilase, selain itu laktat dehidrogenase A, ada aldolase, fosfoglukokinase-1, serta piruvat kinase, enolase dan adrenomedullin).

Banyaknya gen yang menjadi target dari HIF-1 ini dan sebagian besar gen merupakan gen yang vital dalam fungsional tubuh, maka faktor transkripsi ini mempunyai peranan penting terutama dalam keadaan hipoksia (Semenza, 2003). Aktivasi ekspresi HIF-1 dapat dimodulasi oleh konsentrasi oksigen, sinyal transduksi ROS melalui proses fosforilasi, serta faktor pertumbuhan dan sitokin yang mampu memicu ekspresi dari protein HIF-1 (Semenza, 2000).

2.8 Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*)

Heat Shock Protein (Hsp) dikenal juga dengan sebutan stress protein, adalah sekumpulan protein dalam sel suatu makhluk hidup yang dapat ditemukan pada semua fase perkembangan makhluk hidup tersebut. Mereka akan aktif bila terstimulasi oleh berbagai macam stress, seperti *oxidative-stress*, panas, dingin, demam, inflamasi dan gangguan oksigenasi dalam sel serta dalam kondisi sel normal juga dapat ditemukan dan mereka berperan sebagai *Chaperone*.

Chaperone sendiri berasal dari bahasa Perancis yang berarti ‘Pengantar’ atau bila diumpamakan sebutannya adalah ‘calo’. Perumpamaan calo tersebut seperti calo bus yang mengantar penumpangnya ketempat tujuan sementara si-calo tidak akan kemana-mana. Dia akan tetap berada di tempatnya, seperti itu fungsi dari *Chaperone* dalam tubuh. Hsp bertugas memastikan setiap protein dalam tubuh berada dalam bentuk yang seharusnya, ditempat yang seharusnya dan diwaktu yang seharusnya. Disamping hal itu Hsp juga sebagai pengawas untuk

memastikan kematian sel, Hsp akan menentukan sel yang sudah rusak atau sudah tua untuk dihancurkan dalam proses kematian sel (Moncada *et al.*, 2006).

Secara garis besar, Hsp dikelompokkan berdasarkan berat molekulnya (kiloDalton), yaitu: small-Hsp, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 dan Hsp100. Hsp90 adalah protein dalam bentuk dimer dan besar yang hampir dapat ditemukan di semua kompartement dari sel eukaryotic. Hsp90 memiliki fungsi, seperti fosforilasi hsp90 memfasilitasi maturasi klien meningkatkan hubungan chaperone dengan endothelial nitric-oxide syntase (eNOS) enzim yang mengatur Ca^{2+} /calmodulin (CAM)-dependent enzyme yang berperan dalam pembentukan umum NO, memiliki peran pada sintesis NO di vascular endothelium.

NO (nitrogen oksidase) berperan dalam regulasi tekanan darah sistemik, angiogenesis dan arsitektur vaskuler. NO yang berinteraksi dengan dengan mitokondrial system akan meregulasi respirasi sel untuk meningkatkan penurunan ROS (*Reactive oxygen species*) dengan begitu memicu apoptosis sel, pengurangan sintesis basal NO sehingga terjadi vasokonstriksi, peningkatan tekanan darah selain itu juga dapat terjadi pembentukan thrombus (Moncada *et al.*, 2006).

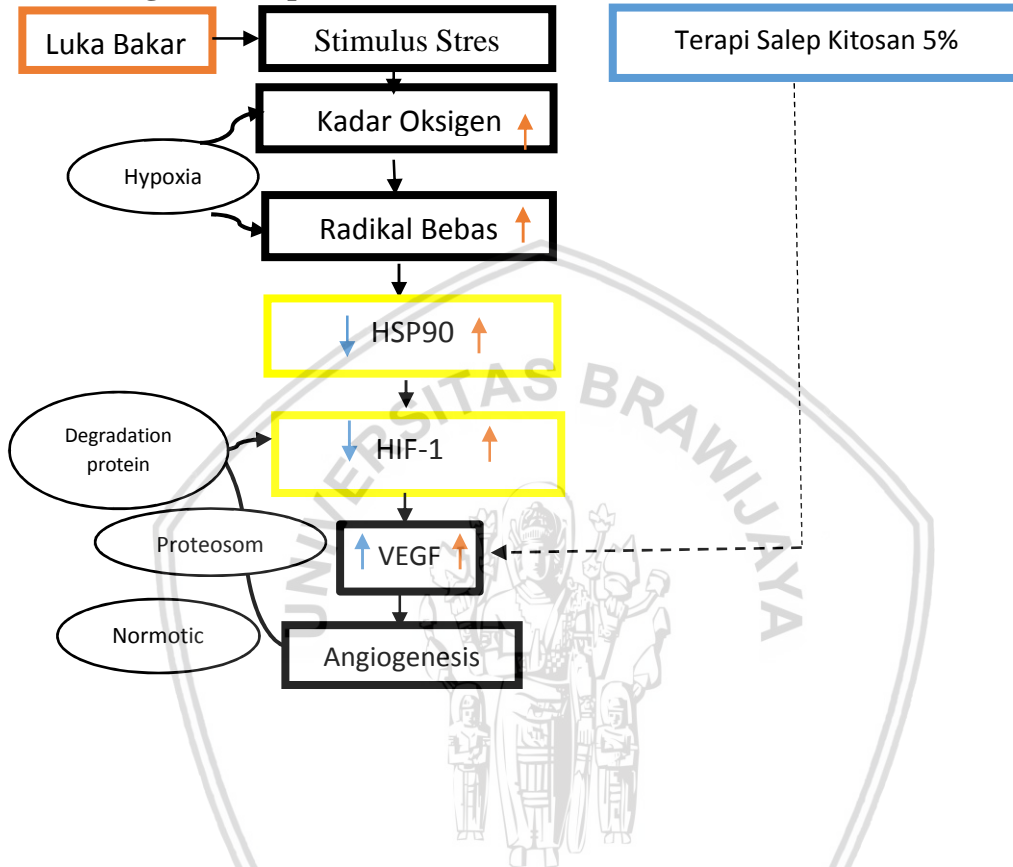
2.9 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi ekspresi suatu protein spesifik ataupun antigen yang ada di dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik yang akan berikatan dengan antigen tersebut. Terdapat dua jenis imunohistokimia, yaitu metode langsung dan metode tidak langsung. Pada metode langsung antibodi yang mengikat fluoresen atau zat warna yang langsung berikatan dengan antigen pada sel. Sedangkan metode tidak

langsung antigen terikat dengan antibodi primer kemudian penambahan antibodi sekunder yang mengikat enzim tertentu seperti peroksidase, alkali fosfatase atau glukosa. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer selanjutnya tambah dengan substrat kromogen sehingga terbentuk warna (pigmen) yang akan mewarnai sel. Sehingga untuk menjamin antibodi agar dapat mengikat antigen sel akan difiksasi terlebih dahulu dengan ditempelkan pada bahan pendukung padat sehingga antigen akan imobile. Hal ini dapat dilakukan dengan membubuhkan sel pada slide mikroskop, coverslip, atau bahan pendukung plastik yang tepat. Ada dua macam metode fiksasi yaitu pelarut organik dan reagen *cross-linking*. Pelarut organik seperti alkohol dan aseton akan memindah lipid, serta mendehidrasi sel dan meninggalkan protein. Reagen *cross-linking* contohnya seperti paraformaldehid membentuk intermolekuler melalui gugus amino bebas. Imunohistokimia melibatkan inkubasi sel dengan antibodi. Antibodi akan berikatan dengan antigen atau protein spesifik dalam sel. Antibodi yang tidak berikatan hilang dengan pencucian sedangkan antibodi yang berikatan dideteksi secara langsung dengan antibodi primer berlabel maupun secara tidak langsung dengan antibodi sekunder berlabel enzim atau fluoresen (Cristine dkk, 2013).

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

 : Induksi salep Kitosan

 : Variabel yang diteliti

 : Induksi Luka Bakar

↑↓ : Stimulasi

↑↓ : Efek pemberian salep kitosan

↑↓ : Efek perlakuan luka bakar

⋮↓ : Target Salep Kitosan

Luka bakar pada kulit tikus akan memicu terjadinya kerusakan jaringan perifer yang mengakibatkan hipoksia sel (stress oksidatif) dan inflamasi. Hipoksia mempengaruhi kadar O_2 dalam sel sehingga mempengaruhi kelangsungan fungsional dalam jaringan maupun sel dan pembuluh darah yang rusak akan menyebabkan perdarahan sehingga tubuh berusaha menghentikan perdarahan dengan vasokonstriksi pembuluh darah, retraksi dan hemostasis.

Perlukaan yang terjadi akan menyebabkan hipoksia fisiologis yang menginduksi pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) atau radikal bebas. *Reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan *second messengers* untuk keluarnya signal proinflamasi atau *growth stimulatory*. Perlukaan oleh panas yang menyebabkan hipoksia dan menimbulkan stress oksidatif mengakibatkan tidak berkecukupan dari suplai O_2 pada sel sehingga menginduksi HIF-1 dan Hsp90.

Heat shock protein (Hsp) adalah suatu protein yang dihasilkan karena adanya *Heat shock response* (HSR). HSR adalah suatu respon berbasis genetik untuk menginduksi gen yang mengkode *molecular chaperone*, protease dan protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan dan pemulihan terhadap jejas seluler. HSR merupakan suatu tanggapan sel terhadap berbagai macam gangguan bersifat fisiologik maupun lingkungan (Westerheide *et al.*, 2005)

Hsp90 adalah salah satu jenis protein *chaperone* yang berpartisipasi dalam pelipatan, pengelompokan, pematangan dan stabilitas protein-protein seluler, terutama yang berperan dalam transduksi sinyal, regulasi siklus sel, pertahanan diri. Hsp90 berperan sebagai salah satu faktor dalam kaskade sinyal untuk aktivasi

Endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). Selain itu penempelan Hsp90 pada eNOS akan mengubah konformasinya sehingga molekul yang dihasilkan dapat berupa nitrit oksida (NO), radikal bebas (O^2) (Aschner *et al.*,2007) Hsp90 berperan dalam melakukan inhibisi terhadap produksi superoksida dan meningkatkan sintesis NO melalui jalur fosforilasi Akt untuk menghasilkan eNOS (Broud *et al.*,2001). eNOS yang teraktivasi akan menghasilkan NO yang penting dalam homeostasis. NO yang dihasilkan oleh sel endotel akan mengakibatkan vasodilatasi dan proliferasi otot polos sehingga membentuk vaskularisasi. Terbentuknya vaskularisasi oleh eNOS akan terjadi timbal balik dengan protein Hsp90 sehingga akan terdegradasi (Davis *et al.*,2006) Hsp90 juga sebagai sinyal yang mengatur transportasi, pematangan dan degradasi rangkaian protein-protein, seperti sinyal protein transkripsi yaitu, HIF-1 .

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) ditemukan di 1992 sebagai faktor transkripsi gen EPO manusia *encoding erythropoietin* (EPO) 1). HIF-1 adalah heterodimerik protein yang terdiri dari subunit yang diatur oleh kadar oksigen. HIF-1 dan yang dinyatakan secara subyektif HIF-1 . HIF-1 dihidroksilasi oleh prolyl hidroksilase 1-3 (PHD1-3) pada prolin residu (Pro402 dan Pro564) segera setelah disintesis novo2. Modifikasi ini memfasilitasi pengikatan dari von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase kompleks dengan HIF-1 , dan akan menghasilkan *ubiquitilation* dan degradasi oleh 26S proteasome. Namun, ketika intraseluler tingkat oksigen berkurang, aktivitas enzimatik PHD dihambat; dan ini mengarah pada stabilisasi protein dan translokasi gen HIF-1 , di mana inisiasi HIF-1 merupakan transkripsi berbagai gen hipoksia adaptif yang terlibat pada angiogenesis, glikolisis,

erythropoiesis, dan *katekolamin biosynthesis*. Perlukaan pada kulit menimbulkan kerusakan jaringan dan pembuluh darah sehingga mengganggu pasokan oksigen dan mengurangi aktivitas *hidroksilase* pada sel. Oksigen merupakan elemen penting dalam proses seluler. Tanggapan seluler terhadap hipoksia dimediasi oleh faktor *hypoxia inducible*. Respon seluler dan respon jaringan terhadap hipoksia dikendalikan melalui *Hypoxia inducible factor signaling* (HIF). Sistem HIF sangat penting dalam merangsang dan mengatur proses patologis, angiogenesis dalam penyembuhan luka maupun perkembangan tumor (Semenza et al.,2010). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tingkat HIF-1 yang tinggi pada respon inflamasi sangat penting untuk mengoptimalkan fase penyembuhan (Mace et al.,2007 dalam Chen et al.,2012). HIF-1 adalah kompleks faktor transkripsi heterodimerik tersusun atas subunit dan (Manalo et al.,2005). Hipoksia menyebabkan stabilisasi HIF-1 dan aktif jalur MAPK yang meningkatkan transkripsi aktivitas HIF-1 melalui fosforilasi. Kedua mekanisme berkontribusi pada aktivasi transkripsi hilir faktor angiogenik (VEGF), erythropoietin (EPO), transporter glukosa (glut 1 dan 3) dan gen glikolitik (PFK) melalui dimer HIF-1 (Hideki et al.,2012)

Ekspresi HIF-1 meningkat ketika oksigen menurun sedangkan HIF-1 ekspresikan secara normal. Pada saat hipoksia, sinyal redoks pada cytosol akan mengaktivasi HIF-1 pada faktor transkripsi mRNA dinukleus dan dengan bantuan oleh HIF-1 akan mengaktifkan faktor transkripsi angiogenik, terutama VEGF (Chen et al.,2012). Sehingga pada saat oksigenasi membaik pada luka, maka enzim proteosom akan membungkam aktivitas HIF-1 kembali stabil.

Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari khitin. Kitosan memiliki kandungan glicoaminoglican (GAG). Kandungan GAG berperan penting dalam modulasi angiogenesis. Pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi yang baru. Angiogenesis merupakan proses yang kompleks berkaitan dengan matriks ekstraseluler pada luka. Induksi angiogenesis juga distimulasi oleh *fibroblas growth factor* (FGF). Faktor-faktor angiogenik terutama basic *fibroblast growth factor* (b-FGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) memfasilitasi terjadinya angiogenesis (Kim *et al.*, 2004 dalam Sularsih, 2016). Sifat biologis kitosan termasuk biodegradasi kitosan oleh enzim lisosim yang akan memecah *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *polimer* menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *dimer* aktif dan membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang merupakan makromolekul matrik ekstraseluler serta dapat membantu menstimulasi peningkatan dari *growth factor* seperti TGF- β 1 dan FGF 2.

Pemberian kitosan akan memicu sel makrofag melalui reseptor *mannose* untuk meningkatkan produksi sitokin yang berupa TGF- β 1. *Transforming growth factor betha 1* (TGF- β 1) dan FGF 2 merupakan *growth factors* yang memicu proliferasi sel fibroblas pada penyembuhan luka. Peran kitosan dalam mengoptimalkan fase inflamasi akan berdampak pula pada pembentukan pembuluh darah. Peningkatan jumlah sel-sel inflamasi pada daerah luka akan memicu faktor-faktor yang menginduksi angiogenesis. Akibatnya, pembentukan pembuluh darah baru dapat semakin cepat terjadi (Chin *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2001) sehingga pada

saat keadaan oksigenasi membaik di luka, akan ada penurunan atau degradasi dari ekspresi protein HIF-1 maupun Hsp90 oleh enzim proteasome akibat dimulainya vaskularisasi membaik pada luka, vaskularisasi yang membaik akan menyuplai nutrisi ke luka untuk menunjang perbaikan sel dan penyembuhan dari luka.

3.2 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesa dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Terapi pemberian salep ekstrak kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dapat mempengaruhi ekspresi HIF-1 pada tikus yang diinduksi luka bakar
2. Terapi pemberian salep ekstrak kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dapat mempengaruhi Hsp90 pada tikus yang diinduksi luka bakar

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Maret 2018 dan penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium yaitu :

1. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan dikandangkan secara individu.
2. Luka bakar dengan plat besi dan pembacaan hasil histopatologi kulit di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Prosedur sintesis kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) di Laboratorium Sintesis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
4. Pembuatan Preparat imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang tikus, restrainer, spuit 1 ml, dissecting set, oven, tumbukan, *magnetic stirrer*, alat cukur, wadah, stopwatch, mikroskop, glove, masker, mikrotom, mortar, ayakan 100 mesh dan 200 mesh serta alat untuk uji imunohistokimia, mortar, alat uji pembacaan software imunoratio, preparat imunohistokimia, waterbath.

Bahan-bahan yang dipersiapkan dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan bobot 150-200 g, ekstrak cangkang Rajungan (*Portunus*

pelagicus), anti monoklonal Hsp90 dan antibody primer anti-HIF-1 *Rabbit polyclonal*, DAB (*Diamino Bensidine*), Aquades, H₂O, entelan, NaCl Fisiologis 0,9%, Alkohol 70%, 95% dan 100%, Keta-xyla, paraffin, air dan tisu, Formalin.

4.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Prosedur sintesis kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)
3. Pembuatan luka bakar pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)
4. Terapi salep kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)
5. Pengambilan sampel kulit dan pembuatan preparat imunohistokimia
6. Perhitungan ekspresi HIF-1 dan Hsp90 dengan metode imunohistokimia
7. Analisa data

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *Rancangan Acak Kelompok* (RAK) dan *post control design only*. Tiap kelompok terdiri dari beberapa kelompok perlakuan tikus. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain adalah :

- 1) Kelompok 1 adalah tikus yang diberi induksi luka bakar dan pemberian salep Kitosan cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan konsentrasi 5% serta diamati pada hari ke-1.

- 2) Kelompok 2 adalah tikus yang diberi luka bakar serta dilakukan terapi salep Kitosan cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan konsentrasi 5% serta diamati pada hari ke-3.
- 3) Kelompok 3 adalah tikus yang diberi luka bakar serta dilakukan terapi salep Kitosan cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan konsentrasi 5% dan diamati hari ke-7.
- 4) Kelompok 4 sebagai kontrol positif adalah tikus yang diberi luka bakar serta pemberian salep Bioplacenton dan diamati pada hari ke-1.
- 5) Kelompok 5 sebagai kontrol positif adalah tikus yang diberi luka bakar serta pemberian salep Bioplacenton dan diamati pada hari ke-3.
- 6) Kelompok 6 sebagai kontrol positif adalah tikus yang diberi luka bakar serta pemberian salep Bioplacenton dan diamati pada hari ke-7.

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat sekitar 150-200 g berumur sekitar 8 minggu. Penelitian ini menggunakan 6 perlakuan, sehingga banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer :

$$(r-1)(t-1) > 15$$

Keterangan :

$$(r-1)(6-1) = 15$$

t : Jumlah perlakuan

$$(r-1) 5 = 15$$

r : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5r-5 = 15$$

$$5r = 20$$

$$r = 4$$

berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 6 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 24 ekor tikus.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variable bebas : dosis terapi salep kitosan cangkang Rajungan
- b. Variabel terikat : penurunan kadar HIF-1 dengan Hsp90 pada jaringan kulit
- c. Variable kontrol : homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, kandang serta perlakuan luka model luka bakar.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yakni tikus diadaptasi selama tujuh hari dan diberi pakan pelet. Kandang yang digunakan berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm serta terbuat dari plastik. Kandang tersebut dibagi menjadi dua bagian dan setiap bagian diisi oleh satu ekor tikus. Kandang tikus dilengkapi dengan fasilitas minum *ad libitum*, sekam kayu dan sekam padi dan kawat penutup. Tikus dipelihara dalam Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Prosedur Sintesis Kitosan cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Bahan baku berupa cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) yang didapatkan dari limbah industri pabrik di Madura sebanyak 2 Kg. Proses produksi dengan melakukan isolasi senyawa kitin dan kitosan dengan menggunakan metode Hong (Salami 1998) dengan cara sebagai berikut ; limbah kulit dicuci dengan air hingga bersih, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Limbah kulit yang telah bersih dihaluskan untuk mendapatkan ukuran sebesar 50 mesh. Selanjutnya dilakukan sintesis kitosan yang terdiri dari tahapan deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi.

a. Deproteinasi

Cangkang rajungan sebanyak 400 gram serbuk yang telah diayak direaksikan dengan 3000 mL NaOH 1 M dan homogenkan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 80°C selama 1 jam. Kemudian disaring dan residu dicuci dengan akuades hingga pH netral, residu tersebut dikeringkan dengan oven dengan suhu 80°C hingga kering \pm 3 jam (Hastuti dan Tulus, 2015).

b. Demineralisasi

Sebanyak 200 gram serbuk deproteinasi ditambahkan dengan 2000 mL HCL 1 M dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 60 menit pada suhu kamar. Setelah itu endapan disaring dan residu dicuci dengan aquades hingga pH netral. Kemudian dikeringkan kembali dengan oven bersuhu 80°C selama 3 jam. Hasil ini disebut dengan kitin (Hastuti dan Tulus, 2015).

c. Deasetilasi

Sebanyak 40 gram serbuk hasil demineralisasi ditambah dengan 250 mL NaOH 50% (b/v), kemudian direfluks didalam labu alas bulat selama 8 jam pada suhu 100°C . Hasil refluks didinginkan, disaring lalu dicuci dengan akuades sampai pH netral. Setelah itu endapan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80°C selama 3 jam. Lalu endapan yang telah kering diletakan dalam desikator selama 24 jam (Hastuti dan Tulus, 2015).

d. Identifikasi Kitosan dengan Metode FTIR

Identifikasi kitosan secara kualitatif dapat dilakukan dengan menggunakan uji FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) adalah suatu teknik spektrofotometri inframerah yang dapat mengidentifikasi kandungan gugus fungsi suatu senyawa. Prinsip kerja FTIR adalah dapat mengenali gugus fungsi suatu senyawa dari absorbansi inframerah yang dilakukan pada senyawa tersebut. Pola absorbansi yang diserap oleh tiap-tiap senyawa berbeda-beda sehingga senyawa tersebut dapat dibedakan (Rachmawati, dkk, 2012).

Kitosan disimpan di desikator selama 24 jam sebelum dibuat pelet KBr (*Kalium bromide*). Pembuatan pelet KBr dengan cara mencampurkan 1 mg sampel dengan 10-100 mg KBr. Setelah pencampuran lalu gerus serbuk sampai homogen dan tekan dengan pompa hidrolik (Azhar dkk, 2010). Pelet yang didapat lalu dilakukan scanning pada daerah frekuensi antara 4000 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} . Spektrum hasil pengukuran yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum kitosan standar.

Pengujian FTIR memiliki beberapa keuntungan, yakni relatif cepat, sampel tidak perlu murni dan tingkat ketelitian tinggi cukup tinggi.

4.4.3 Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Salep biasanya dibuat dengan bahan dasar vaselin album yang termasuk bahan dasar salep hidrokarbon. Pemilihan sediaan salep dengan bahan dasar vaselin album karena sifatnya yang dapat menutup luka sehingga dapat meningkatkan hidrasi pada kulit (Naibaho *et al.*, 2013). Efek hidrasi pada *stratum korneum* akan membuka stratum lapisan epitel serta benang-benang keratin dari *stratum korneum* akan mengembang sehingga kulit menjadi lebih permeable. Dengan kemampuan basis vaselin album yang dapat menghidrasi kulit maka dapat meningkatkan absorpsi zat aktif kitosan pada kulit. Salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dibuat dengan memformulasikan kitosan dengan bahan pembawa vaselin album dengan konsentrasi yaitu 5% dibuat sebanyak 14 gram.

4.4.4 Perlakuan luka bakar pada Tikus

Perlakuan pertama untuk pembuatan luka bakar pada tikus yaitu, menentukan area pembuatan luka bakar, dalam penelitian ini luka akan dibuat dipunggung tikus sebelah kanan atau kiri dengan tujuan untuk menghindari dari gigitan tikus itu sendiri. Kemudian dapat membersihkan dan mencukur pada area yang akan diberi perlakuan luka bakar tersebut sampai jarak 5 cm dari area yang dapat dibuat luka. Sebaiknya beri alas atau perlak untuk tikus saat perlakuan luka bakar, setelah itu bersihkan tangan terlebih dahulu, buka bagian bak steril, memakai sarung tangan

steril. Setelah itu lakukan desinfeksi pada area yang akan dibuat luka dengan menggunakan alcohol. Melakukan anestesi dengan perpaduan Ketamin-Xylazine sebanyak 0,75 ml/ekor secara IM pada tikus. Setelah itu menyiapkan plat besi dengan tebal 2 mm, panjang 2,5 cm dan lebar 2 cm yang dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dengan suhu 98⁰C diatas api atau pemantik. Tempelkan plat besi tersebut selama 15 detik dengan tekanan minimal dan konstan. Setelah 15 detik, plat besi diangkat lalu kompres dengan kassa yang dicelupkan di air (Normal saline).

4.4.5 Terapi Salep Kitosan

Pada masing-masing konsentrasi salep yaitu 5% yang dibuat sebanyak 14 gram dengan interval pemberian sebanyak dua kali dalam sehari dengan cara mengoleskan salep kitosan sebanyak 0,5 gram sehari pada tikus di area luka bakar selama 7 hari secara aseptis (Aditiya dkk, 2012).

4.4.6 Euthanasi dan Isolasi Jaringan Kulit

Euthanasia dilakukan pada hari ke-1, ke-3 dan hari ke-7 setelah semua perlakuan selesai. Euthanasia pada tikus dilakukan dengan metode dislokasio cervicalis. Daerah yang akan diambil kulitnya dibersihkan terlebih dahulu dari rambut-rambut yang mulai tumbuh kembali dan dilakukan pengangkatan jaringan kulit pada daerah luka bakar sepanjang ± 5 cm, ketebalan $\pm 2,5$ mm. Jaringan kulit yang telah diangkat dibilas dengan menggunakan NaCl fisiologis 0,9% dan fiksasi dengan formalin 10% untuk selanjutnya dibuat preparat imunohistokimia.

4.4.7 Prosedur Imunohistokimia dan Perhitungan HIF-1 dan Hsp90

Prinsip dari metode IHK adalah memanfaatkan ikatan antara protein target (antigen) dengan antibodi. Teknik ini diawali dengan pembuatan preparat histologi (histoteknik) lalu diamati dibawah mikroskop. Pada metode IHK, antibodi yang dilabeli enzim sehingga ikatan protein dan antibodi dapat tervisualisasi. Enzim direaksikan dengan substrat kromogen yang dapat teramati dengan mikroskop cahaya. Ekspresi HIF-1 serta Hsp90 diamati pada sel mononuclear seperti sel makrofag yang diamati menggunakan mikroskop BX51 perbesaran 400x. Pemeriksaan dan perhitungan diamati ekspresi warna coklat. Diamati lima bidang pandang berbeda dari masing-masing preparat. Hasil pengamatan kemudian di foto dan diproses menggunakan *software image raster*.

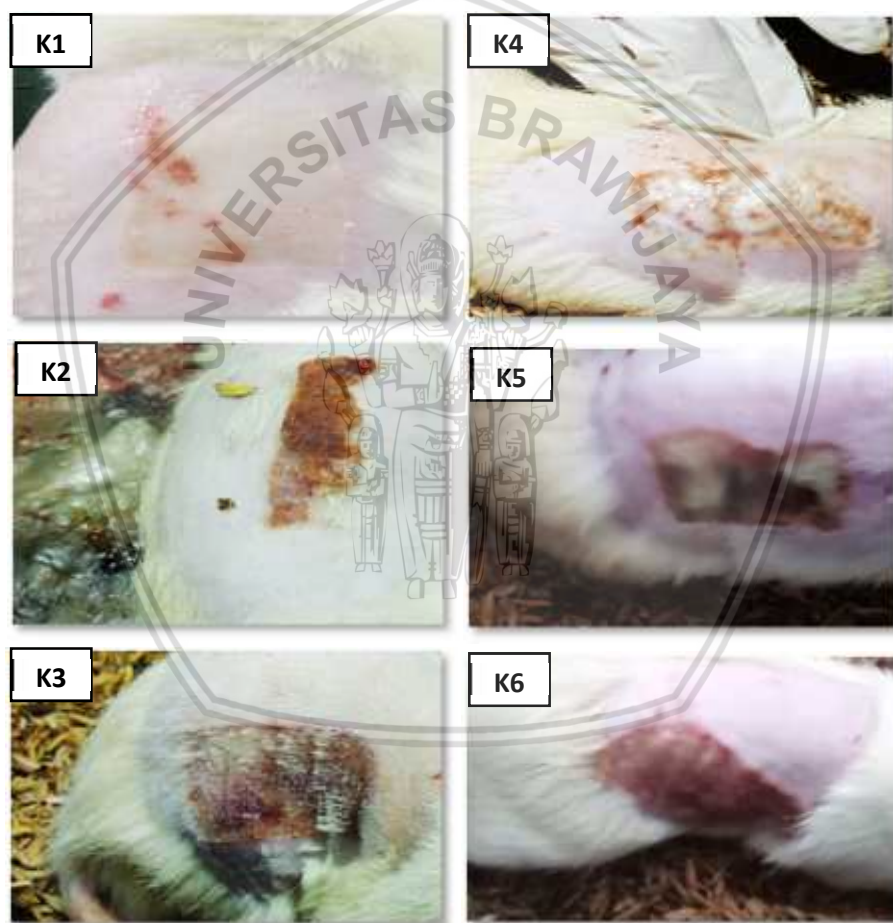
4.5 Analisa Data

Data hasil perhitungan kadar ekspresi HIF-1 dan Hsp90 dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan metode Microsoft Excel dan SPSS for windows dengan analisis statistic ragam *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok penelitian dan apabila ada perbedaan antar perlakuan dapat dilanjutkan dengan uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gambaran makroskopis tikus

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi luka bakar pada daerah punggung kemudian dilakukan terapi menggunakan salep ekstrak kitosan cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) pada bagian yang luka seperti pada Gambar 5.1



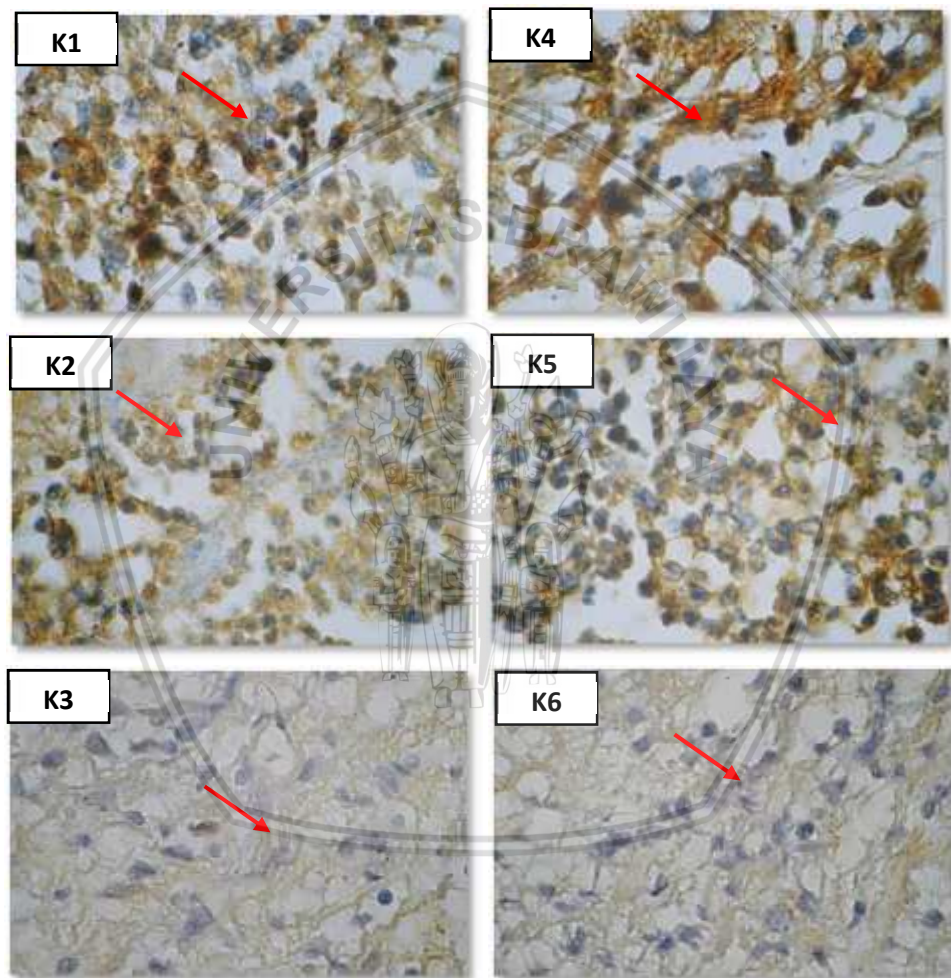
Gambar 5.1 Gambaran makroskopis jaringan kulit tikus (Dokumentasi pribadi)

Keterangan : (K1) adalah kelompok tikus terapi salep kitosan 5% pengamatan hari ke-1, (K2) tikus terapi salep kitosan 5% pengamatan hari ke-3, (K3) tikus terapi salep kitosan 5% pengamatan hari ke-7. (K4) adalah kelompok tikus kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-1, (K5) tikus kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-3, (K6) tikus kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-7.

Gambaran makroskopis jaringan kulit tikus terapi kitosan 5% yang diamati pada hari ke-1 menunjukkan warna putih pucat serta terdapat banyak debris dan mengandung cairan pada area luka yang menandakan ciri dari luka bakar derajat II dangkal yang masih segar (**Gambar 5.1 K1**). Berbeda dengan kulit tikus terapi kitosan 5% yang diamati pada hari ke-3 mulai menunjukan luka yang mengering, debris berkurang namun masih sedikit agak lembab dan belum ditumbuhi rambut (**Gambar 5.1 K2**). Sedangkan kulit tikus terapi kitosan 5% yang diamati hari ke-7 menunjukkan hasil berupa mulai tumbuhnya rambut pada area luka, luka mengering sempurna dan rubor berkurang (**Gambar 5.1 K3**). Pada kelompok kontrol bioplacenton yang diamati pada hari ke-1 menunjukkan terdapat banyak debris pada luka, masih mengandung cairan pada area luka yang masih segar (**Gambar 5.1 K4**). Pada tikus kontrol bioplacenton yang diamati hari ke-3 menunjukkan luka yang masih lembab, masih terdapat rubor pada luka dan belum adanya pertumbuhan rambut pada area luka (**Gambar 5.1 K5**). Sedangkan pada tikus kontrol bioplacenton yang diamati hari ke-7 rubor berkurang, kelembaban sudah mulai berkurang akan tetapi, belum ditumbuhi rambut pada area luka (**Gambar 5.1 K6**). Untuk mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap kesembuhan luka bakar pada tikus dengan cara mempercepat proses inflamasi dari peran serta sel makrofag dilakukan dengan pengamatan ekspresi protein Hsp90 dan HIF-1 dengan menggunakan metode imunohistokimia yang akan dianalisa dengan cara kuantitatif

5.2 Penurunan ekspresi protein Hsp90 pada tikus yang diinduksi luka bakar derajat II dan di terapi salep kitosan 5% dibandingkan dengan kontrol bioplacenton

Gambaran mikroskopis ekspresi Hsp90 oleh sel makrofag ditandai dengan adanya warna kecoklatan pada sitoplasma sel dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.2. Sel makrofag dengan ekspresi Hsp90 ditunjukkan dengan tanda panah yang pewarnaan imunohistokimia (perbesaran 400x)

Keterangan : (K1) adalah kelompok tikus terapi salep kitosan 5% euthanasia hari ke-1, (K2) tikus terapi salep kitosan 5% euthanasia hari ke-3, (K3) tikus terapi salep kitosan 5% euthanasia hari ke-7. (K4) adalah kelompok tikus kontrol bioplacenton euthanasia hari ke-1, (K5) tikus kontrol bioplacenton euthanasia hari ke-3, (K6) tikus kontrol bioplacenton euthanasia hari ke-7.

Berdasarkan hasil gambar di atas bahwa ekspresi Hsp90 pada sel makrofag kelompok terapi kitosan K1 hari ke-1 menunjukkan adanya ekspresi Hsp90 oleh panah warna merah yang banyak begitu juga dengan kelompok kontrol bioplacenton K4 (**Gambar 5.2 K1**). Sedangkan kelompok terapi kitosan K2 pada hari ke-3 menunjukkan ekspresi Hsp90 yang sedikit (**Gambar 5.2 K2**) dan kelompok terapi kitosan K3 hari ke-7 ekspresi Hsp90 hampir tidak ada (**Gambar 5.2 K3**).

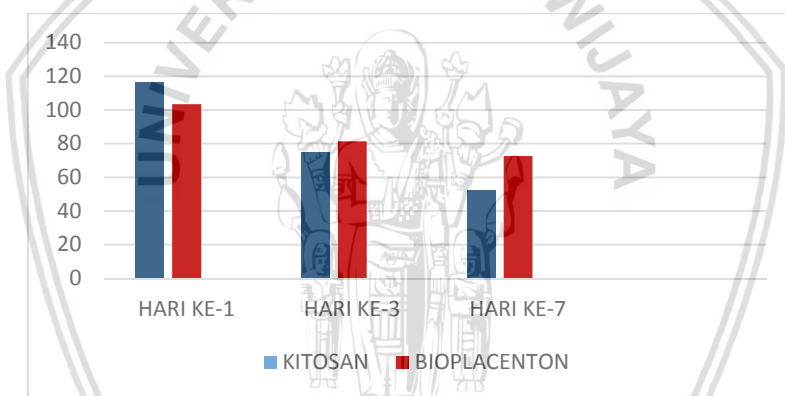
Pada kelompok kontrol bioplacenton K4 hari ke-1 menunjukkan ekspresi Hsp90 yang banyak (**Gambar 5.2 K4**). Kelompok kontrol bioplacenton K5 pengamatan hari ke-3 menunjukkan ekspresi dari Hsp90 yang mulai berkurang (**Gambar 5.2 K5**). Untuk kelompok kontrol bioplacenton K6 yang diamati hari ke-7 masih menunjukkan adanya ekspresi dari Hsp90 yang sangat sedikit (**Gambar 5.2 K6**). Hal tersebut menunjukkan ekspresi protein Hsp90 muncul dalam kondisi awal respon inflamasi normal pada kelompok terapi salep kitosan maupun kelompok kontrol bioplacenton akan tetapi ekspresi dari protein Hsp90 berbeda-beda dari tiap-tiap hari pengamatan. Hasil tersebut menunjukkan terapi ekstrak kitosan cangkang rajungan mempengaruhi fase inflamasi melalui ekspresi protein Hsp90.

Perhitungan jumlah ekspresi Hsp90 dilakukan dengan menggunakan software image raster dan dirata-rata menggunakan Microsoft excel. Data yang diperoleh kemudian diuji statistika dengan menggunakan ANOVA dengan hasil uji statistika pada Lampiran 4.

Tabel 5.2 Ekspresi *Heat shock protein* (Hsp90)

Kelompok	Rata-rata ekspresi Hsp90 (Mean \pm SD)	Penurunan (%)
K1 (Terapi salep Kitosan hari-1)	116.5 \pm 9.2 ^c	-
K2 (Terapi salep Kitosan hari-3)	75.0 \pm 2.0 ^b	35,6
K3 (Terapi salep Kitosan hari-7)	52.5 \pm 1.0 ^a	30
K4 (Terapi salep Bioplacenton hari-1)	103.5 \pm 3.0 ^c	-
K5 (Terapi salep Bioplacenton hari-3)	81.5 \pm 5.25 ^b	21
K6 (Terapi salep Bioplacenton hari-7)	72.7 \pm 7.2 ^a	10

Keterangan: Perbedaan notasi a,b,c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.



Gambar 5.3 Diagram perbandingan nilai rata-rata ekspresi Hsp90 pada terapi salep kitosan dengan terapi kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-1, ke-3 dan ke-7

Berdasarkan Tabel dan diagram perbandingan di atas, rata-rata untuk ekspresi Hsp90 pada hari ke-1, ke-3 dan ke-7 memiliki perbedaan nilai. Pada kelompok kitosan K1 memiliki perbedaan bermakna terhadap K2 dan K3 yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda. Begitupula dengan kelompok kontrol bioplacenton menunjukkan notasi yang serupa dimana K4 memiliki perbedaan bermakna terhadap K5 dan K6 dapat dilihat pada tabel di atas (**Tabel 5.3**)

Kelompok kitosan pengamatan hari ke-1 K1 berbeda bermakna dengan K2 maupun K3 namun kelompok kitosan K1 tidak berbeda bermakna dengan kelompok bioplacenton pengamatan hari ke-1 K4 yang ditunjukkan oleh notasi yang sama. Nilai rata-rata ekspresi protein Hsp90 pada K1 yaitu 116.5 ± 9.2 yang menunjukkan ekspresi dari Hsp90 yang tinggi jika dibandingkan dengan nilai rata-rata ekspresi Hsp90 pada hari ke-3 dan ke-7 kelompok kitosan yang lainnya. Pada kelompok kitosan K1 menunjukkan adanya ekspresi protein Hsp90 yang tinggi sama halnya dengan kelompok Kontrol bioplacenton K4 yang nilai rata-rata 103.5 ± 3.0 . Pada K1 terdapat ekspresi Hsp90 yang tinggi menggambarkan luka masih baru sehingga luka masih dalam respon inflamasi. Perlukaan pada tikus mengakibatkan terjadinya respon inflamasi dan hipoksia akibat kerusakan jaringan dan pembuluh darah sehingga mengganggu konsentrasi oksigen dalam sel dan menginduksi protein *heat shock respon* sebagai respon inflamasi untuk pertahanan sel. Salah satunya *Heat shock protein* (Hsp90) yang merupakan protein yang teraktivasi saat terjadinya stimulus stress serta sebagai protein *chaperone* atau pengantar yang secara tidak langsung berperan dalam respon inflamasi (Moncada *et al.*, 2006)

Kelompok kitosan pengamatan hari ke-3 K2 menunjukan perbedaan bermakna dengan K1 maupun K3 namun tidak berbeda bermakna dengan K5 Kelompok bioplacenton yang ditunjukkan oleh notasi yang serupa. K1 memiliki persentase penurunan sebesar 35,6% terhadap K2. Sedangkan kelompok kontrol bioplacenton K4 memiliki persentase penurunan sebesar 21% terhadap K5. Nilai rata-rata ekspresi Hsp90 untuk K2 yaitu 75.0 ± 2.0 lebih rendah dibandingkan dengan

kelompok kitosan K1 dan K3 maupun kontrol bioplacenton K5 dengan rata-rata 81.5 ± 5.25 . Ekspresi Hsp90 pada kelompok kitosan K2 yang turun tetapi tidak bermakna terhadap K5 menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan bermakna antara kelompok kitosan maupun bioplacenton pada pengamatan hari ke-3. Penurunan ekspresi Hsp90 pada kelompok K2 menggambarkan bahwa sudah dimulai adanya angiogenesis dengan ditunjukkan dari penurunan ekspresi protein stress, Hsp90 protein yang memastikan bahwa sel atau jaringan tubuh dalam kondisi seharusnya, dimana jika terjadi penurunan Hsp90 berarti sel atau jaringan mulai kembali normal. Pada saat tersuplainya oksigen dan nutrisi lainnya pada luka, artinya bahwa vaskularisasi pada luka mulai membaik, sehingga protein Hsp90 akan terdegradasi oleh enzim proteasome untuk distabilkan akibat respon dari masuknya fase penyembuhan (Paul *et al.*, 2017) (Hideki *et al.*, 2012).

Kelompok kitosan pengamatan hari ke-7 K3 berbeda bermakna dengan K1 maupun K2 namun tidak berbeda bermakna dengan kelompok bioplacenton pengamatan hari ke-7 K6 yang ditunjukkan oleh notasi serupa. K2 memiliki persentase penurunan sebesar 30% terhadap K3. Sedangkan kelompok kontrol bioplacenton K5 memiliki persentase penurunan sebesar 10% terhadap K6. Nilai rata-rata ekspresi Hsp90 K3 yaitu 52.5 ± 1.0 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok bioplacenton K6 dengan rata-rata 72.7 ± 7.2 . K3 juga memiliki nilai rata-rata lebih rendah terhadap K1 maupun K2. Penurunan ekspresi pada kelompok kitosan K3 menggambarkan bahwa keadaan luka mulai membaik, didukung oleh adanya pertumbuhan rambut pada gambar makroskopis di area luka **Gambar 5.1** dan

didukung dengan ekspresi protein inflamasi *heat shock protein* yang menurun menunjukkan bahwa pada luka sudah mulai adanya angiogenesis yang baik. Pada fase penyembuhan ditandai dengan vaskularisasi pada luka, hal ini mengakibatkan *heat shock protein* mengalami degradasi. Penurunan Hsp90 menandakan bahwa pada luka sudah mulai adanya vaskularisasi yang merupakan penunjang kesembuhan luka.

Heat shock protein (Hsp) adalah suatu protein yang dihasilkan karena adanya *Heat shock response* (HSR). HSR adalah suatu respon berbasis genetik untuk menginduksi gen yang mengkode *molecular chaperone*, protease dan protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan dan pemulihan terhadap jejas seluler. HSR merupakan suatu tanggapan sel terhadap berbagai macam gangguan bersifat fisiologik maupun lingkungan (Westerheide *et al.*, 2005)

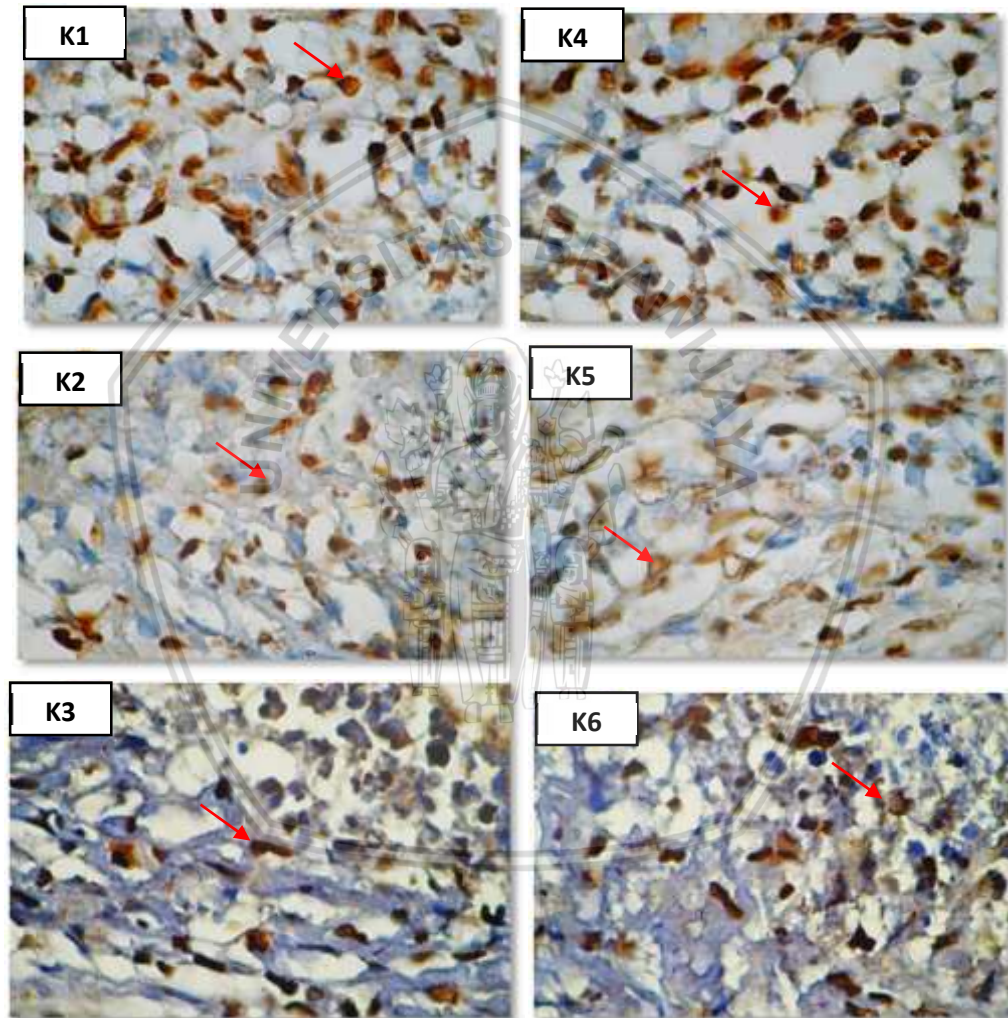
Hsp90 adalah salah satu jenis protein *chaperone* yang berpartisipasi dalam pelipatan, pengelompokan, pematangan dan stabilitas protein-protein seluler, terutama yang berperan dalam transduksi sinyal, regulasi siklus sel, pertahanan diri. Hsp90 berperan sebagai sinyal yang banyak mengatur transportasi, pematangan dan degradasi rangkaian protein-protein, salah satunya adalah sinyal protein transkripsi HIF. Hsp90 juga berperan sebagai salah satu faktor dalam kaskade sinyal untuk aktivasi *Endothelial nitric-oxide synthase* (eNOS). Selain itu penempelan Hsp90 pada eNOS akan mengubah konformasinya sehingga molekul yang dihasilkan dapat berupa nitrit oksida (NO), radikal bebas (O^2) (Aschner *et al.*, 2007) Hsp90 berperan dalam melakukan inhibisi terhadap produksi superoksida dan meningkatkan sintesis NO melalui jalur fosforilasi Akt untuk menghasilkan eNOS (Broud *et al.*, 2001).

eNOS yang teraktivasi akan menghasilkan NO yang penting dalam homeostasis. NO yang dihasilkan oleh sel endotel akan mengakibatkan vasodilatasi dan proliferasi otot polos sehingga membentuk vaskularisasi. Terbentuknya vaskularisasi oleh eNOS akan terjadi timbal balik dengan protein Hsp90 sehingga akan terdegradasi (Semenza *et al.*, 1992 dalam Chen *et al.*, 2012)

Terapi salep kitosan terhadap ekspresi Hsp90 memberikan penurunan yang bermakna pada hari ke-3 maupun ke-7. Hal itu menunjukkan bahwa salep kitosan mampu membantu mempercepat terbentuknya vaskularisasi pada luka. Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari khitin. Kitosan memiliki kandungan glicoaminoglican (GAG). Kandungan GAG berperan penting dalam modulasi angiogenesis. Pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi yang baru. Angiogenesis merupakan proses yang kompleks berkaitan dengan matriks ekstraseluler pada luka. Sifat biodegradasi kitosan oleh enzim lisosim yang akan memecah *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *polimer* menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *dimer* aktif dan membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang merupakan makromolekul matrik ekstraseluler dalam peningkatan TGF- β 1 dan FGF-2. Pemberian kitosan akan memicu sel makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin yang berupa TGF- β 1 dan FGF 2 merupakan *growth factors* yang memicu proliferasi sel fibroblas pada penyembuhan luka. Peningkatan jumlah sel-sel inflamasi pada daerah luka juga akan memicu faktor-faktor yang menginduksi perbaikan angiogenesis pada luka (Chin *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2001)

5.3 Penurunan ekspresi protein HIF-1 pada tikus yang diinduksi luka bakar derajat II dan di terapi salep kitosan 5% dibandingkan dengan kontrol bioplacenton

Gambaran mikroskopis ekspresi HIF-1 oleh sel makrofag ditandai dengan adanya warna kecoklatan pada sitoplasma sel dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.4. Sel makrofag dengan ekspresi HIF-1 ditunjukkan dengan tanda panah yang pewarnaan imunohistokimia (perbesaran 400x)

Keterangan : (K1) adalah kelompok tikus terapi salep kitosan 5% pengamatan hari ke-1, (K2) tikus terapi salep kitosan 5% pengamatan hari ke-3, (K3) tikus terapi salep kitosan 5% pengamatan hari ke-7. (K4) adalah kelompok tikus kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-1, (K5) tikus kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-3, (K6) tikus kontrol bioplacenton pengamatan hari ke-7.

Berdasarkan hasil gambar di atas Gambar 5.4. Kelompok terapi kitosan K1 menunjukkan adanya ekspresi HIF-1 oleh panah merah sangat banyak begitu juga dengan kelompok kontrol bioplacenton K4 pengamatan hari ke-1 (**Gambar 5.4 K1**). Sedangkan kelompok terapi kitosan K2 yang pada hari ke-3 menunjukkan ekspresi HIF-1 yang mulai berkurang (**Gambar 5.4 K2**) dan pada kelompok terapi kitosan K3 pengamatan hari ke-7 ekspresi HIF-1 hampir tidak ada (**Gambar 5.4 K3**).

Pada kelompok kontrol bioplacenton K4 yang diamati hari ke-1 menunjukkan ekspresi HIF-1 yang banyak (**Gambar 5.4 K4**). Kelompok kontrol bioplacenton K5 hari ke-3 juga mulai berkurang untuk ekspresi dari HIF-1 (**Gambar 5.4 K5**) oleh sel makrofag di jaringan kulit. Untuk kelompok kontrol bioplacenton K6 hari ke-7 menunjukkan sedikit sekali ekspresi dari HIF-1 (**Gambar 5.4 K6**).

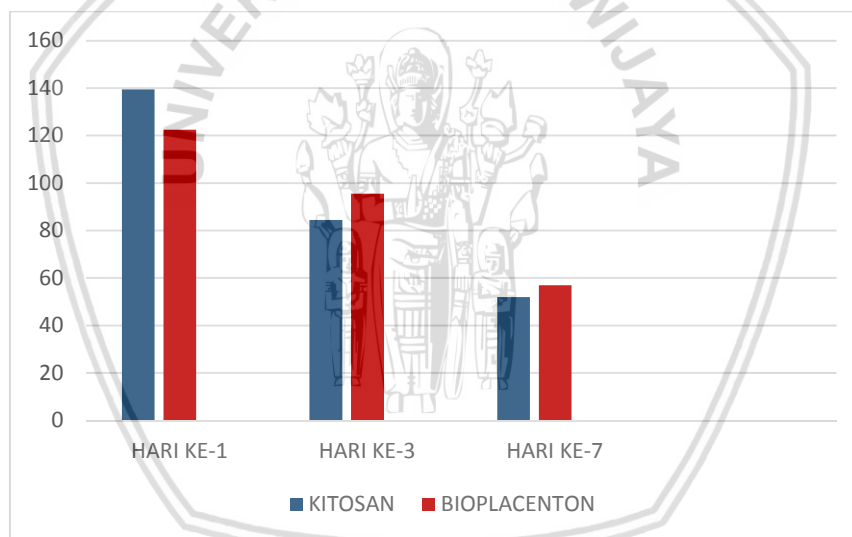
Hal tersebut menunjukkan ekspresi protein HIF-1 muncul dalam kondisi awal luka merupakan respon inflamasi kelompok terapi salep kitosan maupun kelompok kontrol bioplacenton akan tetapi hasil gambaran ekspresi protein HIF-1 berbeda-beda dari tiap-tiap hari pengamatan. Hasil tersebut menunjukkan terapi ekstrak kitosan cangkang rajungan berpengaruh pada ekspresi protein HIF-1 .

Perhitungan jumlah ekspresi Hsp90 dilakukan dengan menggunakan software image raster dan dirata-rata menggunakan Microsoft excel. Data yang diperoleh kemudian diuji statistika dengan menggunakan ANOVA dengan hasil uji statistika pada Lampiran 5, dibawah ini :

Tabel 5.3 Ekspresi *Hypoxia inducible factor* (HIF-1)

Kelompok	Rata-rata ekspresi HIF-1 (Mean \pm SD)	Penurunan (%)
K1 (Terapi salep Kitosan hari-1)	139.5 \pm 18.2 ^c	-
K2 (Terapi salep Kitosan hari-3)	84.5 \pm 2.51 ^b	39
K3 (Terapi salep Kitosan hari-7)	52.0 \pm 3.2 ^a	38
K4 (Terapi salep Bioplacenton hari-1)	122.5 \pm 10.2 ^c	-
K5 (Terapi salep Bioplacenton hari-3)	95.5 \pm 3.0 ^b	22
K6 (Terapi salep Bioplacenton hari-7)	57.0 \pm 6.6 ^a	40

Keterangan: Perbedaan notasi a,b,c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$ antara kelompok perlakuan).



Gambar 5.5 Diagram perbandingan nilai rata-rata ekspresi HIF-1 pada terapi salep kitosan dengan terapi kontrol bioplacenton pada hari ke-1, ke-3 dan ke-7

Berdasarkan Tabel dan diagram perbandingan di atas, rata-rata untuk ekspresi HIF-1 pada hari ke-1, ke-3 dan ke-7 memiliki perbedaan notasi dan nilai. Pada kelompok kitosan K1 memiliki perbedaan bermakna terhadap K2 dan K3 yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda. Begitupula dengan kelompok kontrol

bioplacenton menunjukkan notasi yang serupa dimana K4 memiliki perbedaan bermakna terhadap K5 dan K6 dapat dilihat pada tabel diatas (**Tabel 5.4**)

Kelompok kitosan pengamatan hari ke-1 K1 berbeda bermakna dengan K2 maupun K3 namun kelompok kitosan K1 tidak berbeda bermakna dengan kelompok bioplacenton pengamatan hari ke-1 K4 yang ditunjukkan oleh notasi yang sama. K1 memiliki persentase penurunan sebesar 39% terhadap K2. Sedangkan kelompok kontrol bioplacenton K4 memiliki persentase penurunan sebesar 22% terhadap K6. Nilai rata-rata ekspresi protein HIF-1 pada K1 yaitu 139.5 ± 18.2 yang menunjukkan ekspresi dari HIF-1 yang tinggi jika sama halnya dengan nilai rata-rata ekspresi HIF-1 pada hari ke-3 dan ke-7 kelompok kitosan yang lainnya. Pada kelompok kitosan K1 menunjukkan HIF-1 yang tinggi sama dengan kelompok Kontrol bioplacenton K4 yang nilai rata-rata 122.5 ± 10.2 . Pada K1 terdapat peningkatan ekspresi HIF-1 yang tinggi menggambarkan luka masih baru sehingga luka masih dalam respon inflamasi. Perlukaan pada tikus mengakibatkan terjadinya inflamasi dan hipoksia jaringan sehingga mengganggu konsentrasi oksigen dalam sel yang mengaktifasi protein hipoksia sebagai respon inflamasi. HIF-1 adalah suatu protein faktor transkripsi yang berperan salah satunya dalam hemostasis oksigen, metabolisme energi, status asam basa serta berperan dalam kontrol pertumbuhan dan perkembangan. Adanya sinyal transduksi yang dihasilkan oleh hipoksia akan memicu pembentukan protein HIF-1 yang dapat merangsang respon seluler, angiogenesis sehingga dapat meningkatkan perbaikan vaskular untuk menutrisi luka yang merupakan penunjang penyembuhan luka (Semenza *et al.*, 2003).

Kelompok kitosan pengamatan hari ke-3 K2 menunjukkan perbedaan bermakna dengan K1 dan berbeda bermakna dengan K3 namun tidak berbeda bermakna dengan K5. Kelompok bioplacenton yang ditunjukkan oleh notasi yang serupa. K2 memiliki persentase penurunan sebesar 38% terhadap K3. Sedangkan Kelompok kontrol bioplacenton K5 memiliki persentase penurunan sebesar 40% terhadap K6. Nilai rata-rata ekspresi HIF-1 untuk K2 yaitu 84.5 ± 2.51 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kitosan K1 dan K3 maupun kontrol bioplacenton K5 dengan rata-rata 95.5 ± 3.0 . Ekspresi HIF-1 pada kelompok kitosan K2 yang turun tetapi tidak bermakna terhadap K5 menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan bermakna antara kelompok kitosan maupun bioplacenton pada pengamatan hari ke-3. Penurunan ekspresi protein hipoksia, HIF-1 yang bertindak sebagai faktor transkripsi dalam regulasi gen dan keseimbangan oksigen tingkat seluler maupun sistemik. Gen-gen yang diregulasi oleh HIF-1 diantaranya berkaitan dengan angiogenesis (VEGF) (Semenza *et al.*, 2003). HIF-1 dapat distimulus oleh kadar konsentrasi oksigen, sinyal ROS dan sitokin. Pada saat fase penyembuhan atau konsentrasi O^2 normal maka HIF-1 akan terhidrolisasi dan terdegradasi oleh enzim proteosom (Semenza *et al.*, 1992 dalam Chen *et al.*, 2012)

Kelompok kitosan pengamatan hari ke-7 K3 berbeda bermakna dengan K1 maupun K2 namun tidak berbeda bermakna dengan kelompok bioplacenton pengamatan hari ke-7 K6 yang ditunjukkan oleh notasi serupa. Nilai rata-rata ekspresi HIF-1 K3 yaitu 52.0 ± 3.2 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok bioplacenton K6 dengan rata-rata 57.0 ± 6.6 . K3 juga memiliki nilai rata-rata lebih

rendah terhadap K1 maupun K2. Penurunan ekspresi protein HIF-1 menggambarkan bahwa konsentrasi O^2 sudah normal maka HIF-1 akan terhidrolisasi dan terdegradasi oleh enzim proteosom, keadaan ini adalah hasil dari vaskularisasi pada luka yang mulai membaik sehingga akan ada sinyal negatif untuk menurunkan HIF-1, hal ini didukung adanya pertumbuhan rambut pada gambar makroskopis di area luka **Gambar 5.1** dan didukung dengan ekspresi protein transkripsi HIF-1 yang menurun menunjukkan bahwa luka sudah terjadi vaskularisasi yang baik (Tandara *et al.*,2004). Namun pada pengamatan hari ke-7 ini masih adanya sisa-sisa ekspresi protein HIF-1 menunjukkan bahwa penyembuhan luka masih belum maksimal,dapat di artikan bahwa vaskularisasi yang terjadi belum dalam proses yang optimal.

Perlukaan pada kulit menimbulkan kerusakan jaringan sehingga mengganggu pasokan oksigen. Oksigen merupakan elemen penting dalam proses seluler. Tanggapan seluler terhadap hipoksia dimediasi oleh faktor *hypoxia inducible*. Respon seluler dan respon jaringan terhadap hipoksia dikendalikan melalui *Hypoxia inducible factor signaling* (HIF). Sistem HIF sangat penting dalam mengatur proses patologi, angiogenesis dalam penyembuhan luka maupun perkembangan tumor (Semenza *et al.*,2010). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tingkat HIF-1 yang tinggi pada respon inflamasi sangat penting untuk mengoptimalkan fase penyembuhan (Mace *et al.*,2007 dalam Chen *et al.*,2012). HIF-1 adalah kompleks faktor transkripsi heterodimerik tersusun atas subunit α dan β (Manalo *et al.*,2005). Ekspresi HIF-1 meningkat ketika oksigen menurun sedangkan HIF-1 secara konstitutif diekspresikan. Pada saat hipoksia, sinyal redoks pada cytosol akan mengaktivasi HIF-

1 oleh fosforilasi pada faktor transkripsi mRNA di nukleus dan dengan dimerisasi oleh HIF-1 akan mengaktifkan atau merangsang faktor transkripsi angiogenik, terutama VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Chen *et al.*, 2012). Sehingga pada saat vaskularisasi mulai membaik akan ada sinyal negatif untuk HIF-1 terhidrolisis dan terdegradasi oleh enzim proteosom. Regulasi dari HIF-1 akan kembali stabil. Hal tersebut menggambarkan bahwa sudah mulai terbentuk vaskularisasi untuk menunjang kesembuhan luka. Terapi salep kitosan terhadap ekspresi HIF-1 memberikan penurunan pada pengamatan hari di kelompok kitosan maupun kontrol bioplacenton pada hari ke-3 sampai ke-7. Hal itu menunjukkan bahwa salep kitosan mampu membantu penyembuhan luka.

Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari khitin. Kitosan memiliki kandungan *glikoaminoglikan* (GAG). Kandungan GAG berperan penting dalam modulasi angiogenesis. Pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi yang baru. Angiogenesis merupakan proses yang kompleks berkaitan dengan matriks ekstraseluler pada luka. Induksi angiogenesis juga distimulasi oleh *fibroblas growth factor* (FGF). Faktor-faktor angiogenik terutama basic *fibroblast growth factor* (b-FGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) memfasilitasi terjadinya angiogenesis (Kim F, 2004 dalam Sularsih, 2016). Sifat biologis kitosan termasuk biodegradasi kitosan oleh enzim lisosim yang akan memecah *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *polimer* menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *dimer* aktif dan membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang

merupakan makromolekul matrik ekstraseluler serta menstimulasi peningkatan TGF- β 1 dan FGF 2. Sel inflamasi yang bermigrasi ke arah luka didominasi oleh sel mononuclear seperti sel makrofag.

Pemberian kitosan akan memicu dan meningkatkan sel makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin yang berupa TGF- β 1. *Transforming growth factor betha 1* (TGF- β 1) dan FGF 2 merupakan *growth factors* yang memicu proliferasi sel fibroblas pada penyembuhan luka. Peran kitosan dalam mengoptimalkan fase inflamasi akan berdampak pula pada pembentukan pembuluh darah. Peningkatan jumlah sel-sel inflamasi pada daerah luka akan memicu faktor-faktor yang menginduksi angiogenesis. Akibatnya, pembentukan pembuluh darah baru dapat semakin cepat terjadi (Chin *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2001). Oleh karena itu senyawa kitosan yang membantu proses perbaikan matriks ekstraseluler, membantu memperbaiki dan membentuk vascular dalam sistem angiogenesis sehingga memicu perbaikan oksigenasi dan nutrisi di luka, keadaan ini akan merangsang enzim proteosom sebagai enzim yang berperan dalam meregulasi atau mendegradasi protein yang tidak seharusnya terekspresi pada fase normal luka, sehingga seperti protein HIF-1 maupun Hsp90 yang merupakan protein yang teraktivasi akibat jejas seluler untuk pertahanan sel akan di stabilkan, dan keadaan ini akan menurunkan level ekspresi dari protein HIF-1 dan Hsp90 akibat dari perbaikan jejas seluler luka.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) konsentrasi 5% pada tikus putih yang diinduksi luka bakar derajat II selama 7 hari menurunkan ekspresi protein Hsp90 (*Heat shock protein*) dan HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*).
2. Pemberian terapi salep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) konsentrasi 5% pada tikus putih yang diinduksi luka bakar derajat II selama 7 hari membuktikan bahwa salep kitosan dapat digunakan sebagai alternatif penyembuhan luka bakar.

6.2 Saran

1. Seharusnya diperlukan kontrol negatif untuk mengetahui kondisi kesembuhan normal pada tikus agar dapat sebagai tolak ukur peneliti untuk melihat kesembuhan alamiah dengan kesembuhan yang di terapi salep pada luka.
2. Diharapkan pada penelitian selanjutnya adanya penambahan hari untuk melihat kesembuhan optimal pada luka.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahmat SA., 2014. Luka, Peradangan dan pemulihan. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Gorontalo. Jurnal Entropi vol. 9 (1) pp. 729-738
- Aditiya P.W., H.P. Bari, J.A. Rizqi, T Sri. 2012. Pengaruh Kitosan secara Topikal terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimiawi pada Kulit *Rattus norvegicus*. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Mutiara Medika; 12(3):177-187
- Aschner JL, Foster S, Kaplowitz M. 2007. *Heat shock protein 90* Modulates in the an endothelial *nitric oxide* synthase activity and vascular reactivity in the newborn piglet pulmonary circulation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol ; 292(6)
- Azhar, M., J Efendi, E Syofyeni, R. L Marfa, S Novalina. 2010. Pengaruh konsentrasi Konsentrasi NaOH dan KOH terhadap Derajat Deasetilisasi Kitin dari Limbah Kulit Udang. EKSAKTA : 1(10)
- Azizah, N., 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol dan pH serta Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. Research Note. Jurnal Teknologi Aplikasi Pangan
- Barbara AB, G Glen, S Marjorie. 2013. Willard and Spackman's Occupational Therapy (12th Ed). Lippincott Williams & Wilkins
- Broud A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand J, Feron O. 2001. Hsp90 Ensures for The Transition From The Early Ca^{2+} Dependent To The Late Phosphorylation Dependent Activity Of Endothelial *Nitric Oxide* In Vascular Endothelial Growth Factor Exposed Endothelial Cells. J Biol Chem : 276 (35)
- Broughton, G., J. E Janis, and C.E. Attiger. 2006. *Wound Healing*: Vol 117. buku asli: A Textbook of Histology. Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Cormack DH. 1998 Ham's Histology (Ninth Edition). Philadelphia: JB Lippincott Company.
- Chen, L. Gajendrareddy, and L.A. DiPietro. 2012. Differential Expression of HIF-1 in Skin and Mucosal Wounds. J Biol Dent Res 91(9):871-876, 2012

- Chin L, Halim AS. 2009. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *J Molecular Science* 2009; 10(3): 1300-13.
- Christine, B. 2013. Uji Efektivitas Pupuk Organonitrofos dengan Pupuk Kimia pada Terhadap Pertumbuhan, Serapan Hara, dan Produksi Tanaman Cabai Rawit Kathur (*Capsicum Frutescens*) pada Tanah Ultisol Gedung Meneng. 47 hlm.
- Clark RAF. *Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations*. I. *J Am Acad Dermatol*. 1985;13:701-25.
- Drosou A, A Falabella, R.S.Kirsner. 2003. Antiseptics on Wounds : An Area of in Controversy. *Wounds* 15(5):149-66.
- Eldin, M. S. Mohy. 2008. Chitosan Modified Membranes for Wound Dressing in the Applications: Preparations, Characterization and Bio-Evaluation. *Jurnal Trends Biomater Artif Organs*, Vol. 22 (3), Page : 159
- F.R. Sharp, M. Bernaudin. 2004. HIF-1 and oxygen sensing in the Neuroscience 5 437-46.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15 (6): 1583 -606.
- Haddad JJ. 2002. Oxygen sensing mechanism and regulation of redoxresponsive in the transcription factors in development and physiology. *Respir Res* ;3:1-27.
- Hatz, R.A., R. Niedner, R., and W Vanscheidt. 2004. *Physiology of Wound Healing*. Berlin: Springer-verlag p: 1-16
- Harrison L, K Blackwell. 2004. *Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy* *Oncologist*.;5:31-40.
- Harris, A. L. 2001. Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Rev. Journal Cancer* ;2:38-46
- Hamanaka RB, NS Chandel NS. 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate in the biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. September ; 35(9): 505-513.

- Hastuti, B., dan N. Tulus. 2015. Sintesis Kitosan dari Cangkang Kerang Bulu (*Anadara inflata*) Sebagai Absorben Ion Cu^{2+} . ISBN: 978-602-73159-0-7.
- Holley AK, V Bakthavatchalu, JM Velez-Roman, St. Clair DK. 2011. *Manganese on Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse*. International Journal of Molecular Sciences.;12(12):7114-62.
- Ishihara, M, Matsunaga, M., Hayashi, N, and V Tisler. 2002. Utilisaton of *D- xylose* as carbon source for production of bacterial cellulose, Enzyme and Microbial Technology, 31: 986-991.
- Katschinski , Lu Le , Susann G. Schindler , Tim Thomas , Anne K. Voss and Roland H. Wenger. 2004. Interaction of the PAS B Domain with HSP90 Accelerates Hypoxia-Inducible Factor-1 Stabilization. Cell Physiol Biochem 14:351-360.
- Kasten B.L., L.L Tilzer, D.S Jacobs, W.R Demott, P.R.Finley, R.T.Horvat.2011. In the Laboratory test handbook, 3rd ed. USA: American Medical Association. p.230
- Kangas, M.I. 2000. Synopsis of The Biology and Exploitation of The Blue Swimming Crab, *Portunus pelagicus*, in Western Australia. Fisheries Research Report No.121, <<http://.fish.wa.gov.au>>. Diakses tanggal 6 Januari 2013
- Kim F. 2004. Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as for inaffected by different processing protocols. Thesis. Lousiana State University; 2004. h.6-7.
- Kirsner RS, W.H. Eaglstein. 1993. The wound healing process. Dermatol Clin. 11:629-40. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE
- Krinke, G. J. 2000. The Handbook of Experimental Animals The Laboratory Rat. J Biological research; Vol 232 (45).
- Kurniati, T. 2002. Hubungan antara Kecerdasan Emosi dengan Kecenderungan. Text Problem Focused Coping pada Sales. Pesat, Vol. 2 No. 2.
- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Surabaya : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

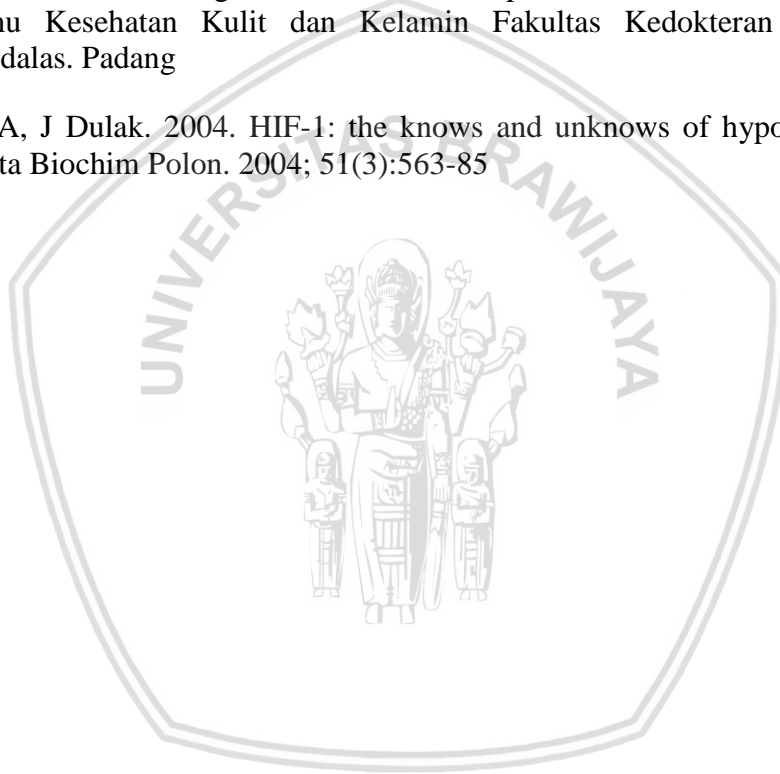
- Li, J., J Chen, R Kirsner. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. Clinics in Dermatology. Vol: 25.
- Loekman, S. Santhy W. Dan Buchari D. 2014. Pemanfaatan Kitosan dari Limbah dari cangkang Rajungan (*Portunus Pelagicus*) pada Pembuatan Hand Body Cream. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Riau.
- Lorentz, H. P., and M.T Longaker. 2006. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment in Mathes Plastic surgery. Saunders Elsevier Philadelphia.
- Mace KA, Yu DH, Paydar KZ, Boudreau N, Young DM (2007). Sustained expression of HIF-1 α in the diabetic environment from promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. Wound Repair Regen 15:636-645
- Mackay, D. and AL Milley, 2003. Nutritional support for Wound Healing Altern Me Rev : 8 (4). 360,361.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. (2005). In the Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. Blood 105:659-669.
- McKenzie JC, RM Klein. 2000. Basic Concepts in Cell Biology and Histology. A Student's Survival Guide. New York: McGraw-Hill.
- Mescher AL. 2010. Junqueira's Basic Histology Text & Atlas. New York: McGraw Hill Medical ; vol (24) 11-14
- Mikkelsen RB, Wardman. 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and Radiationinduced signal transduction Oncogene. (37): 5734-54.
- Mizuno, K., K Yamamura, K Yano, T Osada, S Saeki and N Takimoto. 2002. A Effect of Chitosan Film Containing Basic Fibroblast Growth Factor on Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. J. of Biomed Mat Res.64A (1): 177-181
- Moncada S, EA Higgs. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol. 147 Suppl 1:S193-S201
- Muscari, M. 2005. Keperawatan Pediatric. Edisi 3. Jakarta: EGC.

- Multazam. 2002. Prospek pemanfaatan cangkang rajungan (*Portunus sp*) sebagai untuk suplemen pakan ikan. [skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat.
- Naibaho, O.H., V.Y.Y Paulina, W. Weny. 2013. Pengaruh Basis Salep Terhadap peran Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Omicum sanctum L.*) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuat Infeksi *Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah Farmasi Unstrat: 2(02). New York : Academy Press.
- Onyema, OO., Farombi, EO., Emerole, GO. 2006. Effect of vitamin E on *Monosodium Glutamate* induced Hepatotoxicity and *Oxidative Stress* in Rats. Indian J Biochem Biophys. Volume 43,p.20-3.
- Paul, CI., Masamba, P., Babatunji, EO., Kappo, AP. 2017. Roles of Heat shock protein in Apoptosis, Oxidative stress, Human inflammatory diseases and Cancer. Pharmaceuticals J. Africa. Vol: 2-11
- Paul, W., dan C.P. Sharma. 2004. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A ShortReview, Trends Biomaterial Artificial Organs, Vol 18 (1), pp 18-23
- Pavletic, M.M. 2010. Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery. Edisi ke 3. Wiley-Blackwell, Iowa
- Peck, A. E. 2012. Introduction to Linear Regression Analysis. New York: A Wiley-Intersection Publication.S20 Jurnal Biomedik (JBM), Volume 5, Nomor 3, Suplemen, November 2013, hlm. S12-20
- Pillai, C. K. S., CP Sharma. 2009. Electrospinning of Chitin and Chitosan Nanofibres. Trends Biomater. Artif.Organs; 22(3):179-201
- Potter, A dan A.G Perry. 2007. Buku Ajar Fundamental Keperawatan: ECG (Jakarta).
- Ratnawati, B. TW Kristanto, Agustini, SE. dan J. Hutabarat. 2011. Diversifikasi dan Pemasaran Snack Kalsium (Ca) Berbasis Limbah Cangkang Kerang Simping (Kaji Tindak di Kota Semarang). Karya UNDIP Untuk Anak Bangsa. Universitas Diponegoro, Semarang.Proses, Dan Praktik, edisi 4, Volume.2. Jakarta: EGC.
- Rachmawati, W., D. Herasari, Husniati. 2012. Produksi Kitosan dari Bahan Baku dari Cangkang Udang Menggunakan Metode Kimia dan Enzimatis dengan Enzim Kitin Deasetilase. Skripsi. Universitas Lampung

- Rizzo, D. C. 2001. *Delmar's Fundamentals of Anatomy and Physiology*. New York: Thomson Learning
- Rochima, E., M.T. Suhartono, D Syah dan Sugiyono. 2004. Karakterisasi Kitosan hasil Deasetilasi Enzimatis oleh Kitin Deasetilase Isolat Bacillus papandayan K29-14. Universitas Padjajaran.
- Rodeheaver G. 1994. Definition and guiedelines for assessment of the wounds healing evaluation of healing. Arch Dermatol. 130:489-93.
- Ross MH, W. Pawlina. 2011. *Histology a Text and Atlas* (Sixth Edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins.
- Rudall N, A Green. 2010. Burns clinical features and prognosis. Clinical Pharmacist. 2: 245-8
- Saunders E, RG Kessel .2007. Basic Medical Histology. The biology of Cells, Tissues, and Organs. New York: Oxford University Press
- Salami, I., O Adeyemi, S Adejuyigbe, A Olusegun, & A Adekoya, F Adebayo. 1998. Manual Lifting Task Methods and Low Back Pain Among Constraction Workers In The Southern Nigeria. Global Journal in Researches in Engineering Volume 13(3), (27-29).
- Semenza, GL. 2003. *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nature Rev.Cancer 3:721-32.
- Semenza GL. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. J Appl Physiol ;88:1474-80.
- Semenza GL, Wang GL (1992). A nuclear factor induced by hypoxia protein synthesis inds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for the transcriptional activation. Mol Cell Biol 12:5447-5454.
- Singer AJ, RAF Clark. 2000. Cutaneous wound healing. N Engl J Med 341:738-46.
- Simon HU, AH Yehia, FL Scaffer. 2000. Role of *reavtive Oxygen species* (ROS) in Apoptosis Induction. Apoptosis 5:415-8
- Srijanto B. 2003. Kajian Pengembangan Teknologi Proses Produksi Kitin dan Kitosan secara Kimiawi. Prosiding Semnas Teknik Kimia Indonesia(1): 1-5

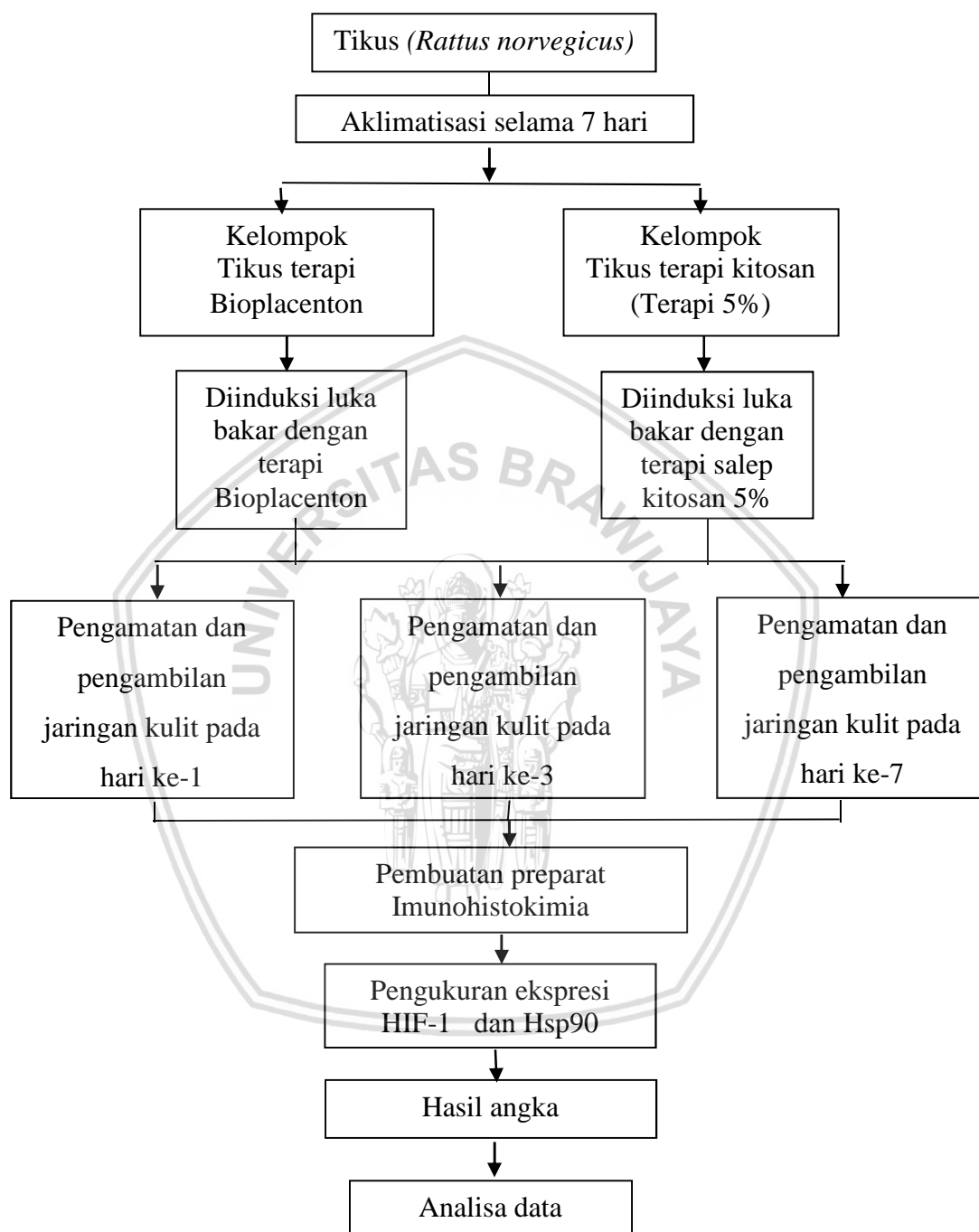
- Suadela. P. 2004. Analisis Tingkat Keramahan Lingkungan Unit Penangkapan Jaring Rajungan Studi Kasus di Teluk Banten. [Skripsi] Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sularsih. 2016. Penggunaan kitosan dengan berat molekul berbeda terhadap jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka pencabutan gigi. Jurnal PDGI ,vol 65 (31-35)
- Sunil P. V Malhorta, Mohan Reddy, MD Stephan, MD Thelitz, You- Ping He. D. and Michael McMullan, L Frank L. Hanley. 2001. The role of oxidative stress in the development of pulmonary arteriovenous malformations after in the cavopulmonary anastomosis from the National Heart, Lung, and Blood Institute of the National Institutes of Health.
- Sunarto. 2011. Sintesis Kitosan dan Pemanfaatannya Sebagai Anti Mikrobial Ikan segar. Laporan Penelitian dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang
- Suriadi. 2004. Perawatan Luka Edisi 1. Jakarta: CV Sagung Seto.
- Suzanne. 2001. Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah. (Edisi 8). Jakarta: EGC
- Syamsuhidayat, R., WD Jong. 2004. Buku Ajar Ilmu Bedah, Edisi II. Jakarta: EGC
- Tandara AA, Mustoe TA (2004). Oxygen in wound healing, more than a nutrient. World J Surg 28:294-300.
- Ueno H, Nakamura F, Mukarami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. 2001. In Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and growth factors production by macrophages. J Biomaterials 2001; 22: 2125-30.
- Vasudeva, N., S Mishra. 2014. Inderbir Singh's Textbook of Human Histology with Colour Atlas and Practical Guide. Seventh Edition. The Health Sciences Publishers, London.
- Vaupel P, L Harrison. 2004. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory from the mechanisms, and cellular response. Oncologist 5:4-9.
- Vaupel P, O Thews, M Hoeckel. 2001. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. Med Oncol 18(4):243-59.

- Vegad, J.L.,2007. Textbook of Veterinary General Pathology. New Delhi: Vikas the Publishing House PVT LTD hlm 82-153.
- Westerheide SD, Morimoto RI. 2006. Heat shock response modulator as therapeutic tools for diseases of protein conformation. J biochem. Vol 280 :97-100
- Woodley, M. & A Whelan. 2009, Pedoman Pengobatan, Yogyakarta, Yayasan Essentia Medica dan Andi Offset, 390.
- Yanhendri, S,. 2012. Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi. Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Padang
- Zagorska A, J Dulak. 2004. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. Acta Biochim Polon. 2004; 51(3):563-85



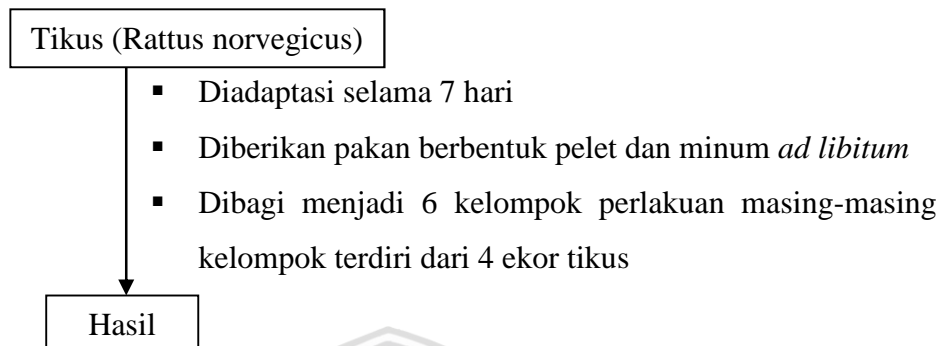


Lampiran 1. Kerangka Operasional Penelitian

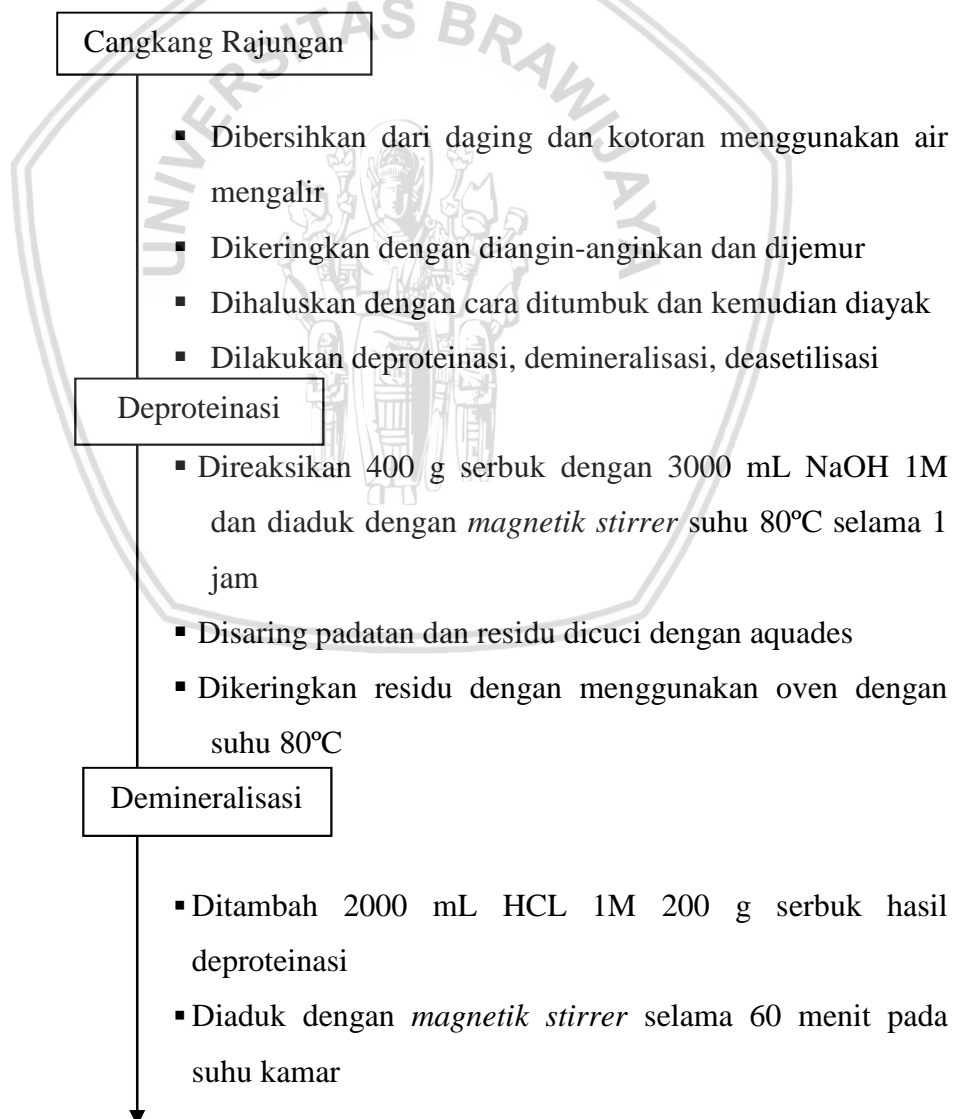


Lampiran 2. Langkah Kerja Penelitian

a. Persiapan Hewan Coba



b. Prosedur Sintesis Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)



Deasetilisasi

- Disaring endapan, residu dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan oven bersuhu 80°C selama 3 jam
- Ditambah 250 mL NaOH 50% 40 g hasil demineralisasi
- direfluks didalam labu alas bulat selama 8 jam pada suhu 100°C, didinginkan hasil refluks dan disaring lalu dicuci dengan akuades
- Dikeringkan endapapan dengan oven 80°C selama 3 jam
- Dimasukan endapan dalam desikator selama 24 jam

Hasil

c. Pembuatan Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan

Mortar

- Ditimbang kitosan sebanyak 0,7 g dan vaselin album sebanyak 13,3 g (konsentrasi 5%)
- Dicampur kitosan dan vaselin album hingga homogen disimpan dalam tube dan dilabel

Hasil

d. Pembuatan Luka Bakar pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus (*Rattus norvegicus*)

- Dilabel pada ekornya dengan spidol tahan air
- Dianestesi dengan keta-xyla dosis 0,75 ml/ekor IM pada kaki belakang
- Dibersihkan daerah luka bakar di punggung tikus dengan NaCl fisiologis 0.9% dan dicukur
- Dibersihkan area luka bakar dengan NaCl fisiologis 0,9%
- Disiapkan plat besi dan api bunsen, plat besi berukuran tebal 2 mm, panjang 2,5 cm dan lebar 2 cm
- Dipanaskan plat besi selama 10 menit pada air mendidih

- Disiapkan tikus yang akan diinduksi luka bakar
- Ditempelkan plat besi pada daerah yang akan dibuat luka bakar selama 15 detik
- Diangkat balok lalu kompres dengan normal saline selama 1 menit

Hasil

e. Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Tikus (*Rattus norvegicus*)

- Dioleskan salep kitosan sebanyak 0,25 g pada area luka secara aseptis dengan frekuensi pemberian 2 kali sehari selama 7 hari

Hasil

f. Pengambilan Jaringan Kulit

Tikus (*Rattus norvegicus*)

- Dilakukan euthanasi dengan dislokasi leher
- Diposisikan rebah dorsal
- Dibersihkan area punggung bagian luka dari bulu
- digunting kulit dengan ketebalan $\pm 2,5$ mm hingga subkutan dengan panjang ± 5 cm
- diisolasi dan dicuci kulit dengan NaCl fisiologis 0,9%
- dipotong kulit menjadi dua bagian
- dimasukan masing-masing bagian kulit dalam pot berisi BNF 10% dan dibiarkan selama 48 jam

Hasil

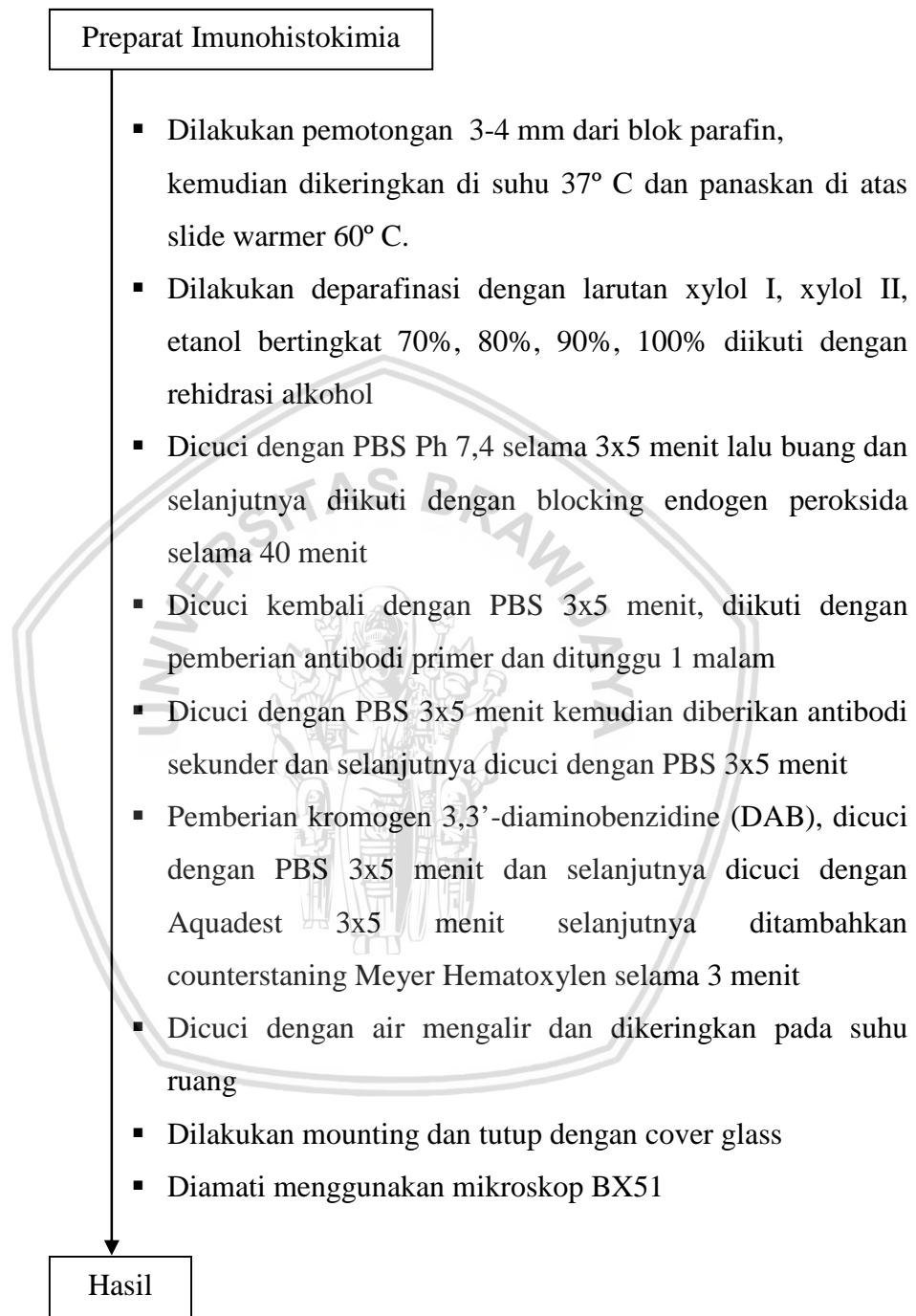
g. Pembuatan Preparat Kulit

Jaringan Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*)

- Dilakukan *tissue trimming* setelah difiksasi BNF 10% dan dimasukkan ke dalam *casette tissue* dari plastik
- Dilakukan proses dehidrasi alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, dan alkohol absolut II masing-masing selama 2 jam
- Dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan xylol II masing-masing selama 2 jam
- Dilakukan proses parafinisasi menggunakan parafin I dan parafin II
- Dimasukkan ke dalam cetakan berisi parafin setengah volume dan diletakkan didasar parafin didiamkan hingga mengeras
- Ditambahkan lagi parafin hingga volume penuh dan dibiarkan mengeras
- Dilakukan pemotongan setebal 5 mikrometer menggunakan mikrotom
- Dibentangkan hasil potongan yang berupa pita diatas air hangat 46°C dan langsung diangkat
- Diletakkan diatas gelas objek an dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60°C

Hasil

h. Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHK)



Lampiran 3. Perhitungan Konsentrasi Salep Kitosan

Sediaan salep yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu memiliki konsentrasi kitosan cangkang rajungan yaitu 5% dan dibuat sebanyak 14 Gram yang dioleskan dua kali sebanyak 0,25 g sehari pada luka selama tujuh hari.

a. Perhitungan salep kitosan konsentrasi 5% :

Jumlah kitosan : $14 \text{ g vasetin} \times 5\% = 0,7 \text{ g}$

Jumlah vasetin : $14 \text{ g} - 0,7 \text{ g} = 13,3 \text{ g}$

R/ Kitosan cangkang rajungan 0,7 g

Vasetin album 14 g

Lampiran 4. Perhitungan Volume Obat Anastesi

Ketamin HCL 10%

Dosis Ketamin 75 sampai 90 mg/KgBB (yang dipakai 80 mg/KgBB)

Berat badan tikus 150 gram = 0,15 Kg

Konsentrasi Ketamine 100 mg/mL

$$\begin{aligned} \text{Volume Ketamine HCL 10\%} &= \frac{\text{Dosis} \times \text{Berat badan}}{\text{Konsentrasi}} \\ &= \frac{80 \text{ mg/kg} \times 0,15 \text{ kg}}{100 \text{ mg/mL}} = 0,12 \text{ ml} \end{aligned}$$

Xylazine 2 %

Dosis xylazine 5 sampai 10 mg/KgBB (yang dipakai 10 mg)

Berat Badan 150 gram = 0,15 kg

Konsentrasi Xylazine 20 mg/mL

$$\begin{aligned} \text{Volume Xylazine 2 \%} &= \frac{\text{Dosis} \times \text{Berat badan}}{\text{Konsentrasi}} \\ &= \frac{10 \text{ mg/kg} \times 0,15 \text{ kg}}{20 \text{ mg/mL}} = 0,075 \text{ ml} \end{aligned}$$

Total Anastesi 0,12 mL + 0,075 mL = 0,195 mL

Total Anastesi 24 tikus 0,195 mL x 24 ekor tikus = 4,68 mL

Lampiran 5. Analisa statistika kitosan dan bioplacenton terhadap ekspresi protein Hsp90

Between-Subjects Factors			
		Value Label	N
SALEP	1.00	BIOPLACENTON	12
	2.00	KITOSAN	12
HARI	1.00	HARI KE-1	8
	2.00	HARI KE-3	8
	3.00	HARI KE-7	8
ULANGAN	1.00	1	6
	2.00	2	6
	3.00	3	6
	4.00	4	6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: HSP90

F	df1	df2	Sig.
.	23	0	.

HSP90

Tukey HSD^{a,b}

HARI	N	Subset		
		1	2	3
HARI KE-7	8	62.6250		
HARI KE-3	8		78.2500	
HARI KE-1	8			110.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HSP90

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9590.417 ^a	6	1598.403	17.886	.000
Intercept	167835.375	1	167835.375	1878.084	.000
SALEP	126.042	1	126.042	1.410	.251
HARI	9324.250	2	4662.125	52.169	.000
ULANGAN	140.125	3	46.708	.523	.672
Error	1519.208	17	89.365		
Total	178945.000	24			
Corrected Total	11109.625	23			

a. R Squared = ,863 (Adjusted R Squared = ,815)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HSP90

Tukey HSD

(I) HARI	(J) HARI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
HARI KE-1	HARI KE-3	31.7500 [*]	4.72666	.000	19.6244	43.8756
	HARI KE-7	47.3750 [*]	4.72666	.000	35.2494	59.5006
HARI KE-3	HARI KE-1	-31.7500 [*]	4.72666	.000	-43.8756	-19.6244
	HARI KE-7	15.6250 [*]	4.72666	.011	3.4994	27.7506
HARI KE-7	HARI KE-1	-47.3750 [*]	4.72666	.000	-59.5006	-35.2494
	HARI KE-3	-15.6250 [*]	4.72666	.011	-27.7506	-3.4994

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 89,365.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HSP90

Tukey HSD

(I) HARI	(J) HARI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
HARI KE-1	HARI KE-3	31.7500 [*]	4.72666	.000	19.6244	43.8756
	HARI KE-7	47.3750 [*]	4.72666	.000	35.2494	59.5006
HARI KE-3	HARI KE-1	-31.7500 [*]	4.72666	.000	-43.8756	-19.6244
	HARI KE-7	15.6250 [*]	4.72666	.011	3.4994	27.7506

HARI KE-7	HARI KE-1	-47.3750 [*]	4.72666	.000	-59.5006	-35.2494
	HARI KE-3	-15.6250 [*]	4.72666	.011	-27.7506	-3.4994

Descriptive Statistics

Dependent Variable: HSP90

SALEP	HARI	ULANGAN	Mean	Std. Deviation	N
BIOPLACENTON	HARI KE-1	1	106.0000	.	1
		2	102.0000	.	1
		3	100.0000	.	1
		4	106.0000	.	1
		Total	103.5000	3.00000	4
	HARI KE-3	1	84.0000	.	1
		2	74.0000	.	1
		3	82.0000	.	1
		4	86.0000	.	1
		Total	81.5000	5.25991	4
	HARI KE-7	1	76.0000	.	1
		2	62.0000	.	1
		3	75.0000	.	1
		4	78.0000	.	1
		Total	72.7500	7.27438	4
	Total	1	88.6667	15.53491	3
		2	79.3333	20.52641	3
		3	85.6667	12.89703	3
		4	90.0000	14.42221	3
		Total	85.9167	14.38723	12
KITOSAN	HARI KE-1	1	128.0000	.	1
		2	120.0000	.	1
		3	110.0000	.	1
		4	108.0000	.	1
		Total	116.5000	9.29157	4
	HARI KE-3	1	74.0000	.	1
		2	74.0000	.	1
		3	74.0000	.	1
		4	78.0000	.	1
		Total	75.0000	2.00000	4

Total	HARI KE-7	1	54.0000	.	1
		2	52.0000	.	1
		3	52.0000	.	1
		4	52.0000	.	1
		Total	52.5000	1.00000	4
	Total	1	85.3333	38.27967	3
		2	82.0000	34.69870	3
		3	78.6667	29.28026	3
		4	79.3333	28.02380	3
		Total	81.3333	28.13388	12
	HARI KE-1	1	117.0000	15.55635	2
		2	111.0000	12.72792	2
		3	105.0000	7.07107	2
		4	107.0000	1.41421	2
		Total	110.0000	9.44155	8
	HARI KE-3	1	79.0000	7.07107	2
		2	74.0000	.00000	2
		3	78.0000	5.65685	2
		4	82.0000	5.65685	2
		Total	78.2500	5.06388	8
	HARI KE-7	1	65.0000	15.55635	2
		2	57.0000	7.07107	2
		3	63.5000	16.26346	2
		4	65.0000	18.38478	2
		Total	62.6250	11.84347	8
	Total	1	87.0000	26.19160	6
		2	80.6667	25.53951	6
		3	82.1667	20.59531	6
		4	84.6667	20.77178	6
		Total	83.6250	21.97788	24

Lampiran 6. Analisa statistika kitosan dan bioplacenton terhadap ekspresi protein HIF-1

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: HIF

F	df1	df2	Sig.
.	23	0	.

HIF

Tukey HSD^{a,b}

HARI	N	Subset		
		1	2	3
HARI KE-7	8	54.5000		
HARI KE-3	8		90.0000	
HARI KE-1	8			131.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
SALEP	1.00	BIOPLACENTON	12
	2.00	KITOSAN	12
HARI	1.00	HARI KE-1	8
	2.00	HARI KE-3	8
	3.00	HARI KE-7	8
ULANGAN	1.00	1	6
	2.00	2	6
	3.00	3	6
	4.00	4	6

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HIF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23813.333 ^a	6	3968.889	33.172	.000
Intercept	202400.667	1	202400.667	1691.648	.000

SALEP	.667	1	.667	.006	.941
HARI	23449.333	2	11724.667	97.994	.000
ULANGAN	363.333	3	121.111	1.012	.412
Error	2034.000	17	119.647		
Total	228248.000	24			
Corrected Total	25847.333	23			

a. R Squared = .921 (Adjusted R Squared = .894)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HIF

Tukey HSD

(I) HARI	(J) HARI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
HARI KE-1	HARI KE-3	41.0000*	5.46916	.000	26.9696	55.0304
	HARI KE-7	76.5000*	5.46916	.000	62.4696	90.5304
HARI KE-3	HARI KE-1	-41.0000*	5.46916	.000	-55.0304	-26.9696
	HARI KE-7	35.5000*	5.46916	.000	21.4696	49.5304
HARI KE-7	HARI KE-1	-76.5000*	5.46916	.000	-90.5304	-62.4696
	HARI KE-3	-35.5000*	5.46916	.000	-49.5304	-21.4696

Descriptive Statistics

Dependent Variable: HIF

SALEP	HARI	ULANGAN	Mean	Std. Deviation	N
		1	118.0000	.	1
		2	136.0000	.	1
	HARI KE-1	3	124.0000	.	1
		4	112.0000	.	1
		Total	122.5000	10.24695	4
BIOPLACENTON		1	92.0000	.	1
		2	98.0000	.	1
	HARI KE-3	3	94.0000	.	1
		4	98.0000	.	1
		Total	95.5000	3.00000	4
		1	66.0000	.	1
	HARI KE-7	2	58.0000	.	1
		3	52.0000	.	1

KITOSAN		4	52.0000	.	1
		Total	57.0000	6.63325	4
		1	92.0000	26.00000	3
		2	97.3333	39.00427	3
	Total	3	90.0000	36.16628	3
		4	87.3333	31.39002	3
		Total	91.6667	28.82970	12
		1	154.0000	.	1
		2	154.0000	.	1
	HARI KE-1	3	134.0000	.	1
		4	116.0000	.	1
		Total	139.5000	18.28478	4
		1	82.0000	.	1
		2	84.0000	.	1
	HARI KE-3	3	88.0000	.	1
		4	84.0000	.	1
		Total	84.5000	2.51661	4
		1	48.0000	.	1
		2	52.0000	.	1
	HARI KE-7	3	52.0000	.	1
		4	56.0000	.	1
		Total	52.0000	3.26599	4
Total		1	94.6667	54.12332	3
		2	96.6667	52.16640	3
	Total	3	91.3333	41.10150	3
		4	85.3333	30.02221	3
		Total	92.0000	38.96852	12
		1	136.0000	25.45584	2
		2	145.0000	12.72792	2
	HARI KE-1	3	129.0000	7.07107	2
		4	114.0000	2.82843	2
		Total	131.0000	16.45774	8
		1	87.0000	7.07107	2
		2	91.0000	9.89949	2
	HARI KE-3	3	91.0000	4.24264	2
		4	91.0000	9.89949	2
		Total	90.0000	6.41427	8

	1	57.0000	12.72792	2
	2	55.0000	4.24264	2
HARI KE-7	3	52.0000	.00000	2
	4	54.0000	2.82843	2
	Total	54.5000	5.52914	8
	1	93.3333	38.00351	6
	2	97.0000	41.19709	6
Total	3	90.6667	34.63332	6
	4	86.3333	27.49303	6
	Total	91.8333	33.52308	24

Lampiran 6 salep bioplacenton



Lampiran 7 Cangkrang rajungan (*Portunus pelagicus*)



Lampiran 8 Plat Besi untuk induksi Luka bakar



Lampiran 9 Proses Pembuatan Salep Kitosan



Lampiran 10 Proses Pewarnaan Imunohistokimia



Lampiran 10. Surat Keterangan Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 943-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL	TERAPI PEMBERIAN EKSTRAK KITOSAN CANGKANG RAJUNGAN (<i>Portunus pelagicus</i>) TERHADAP EKSPRESI HIF-1 α DAN PROTEIN HSP 90 PADA TIKUS PUTIH (<i>Rattus norvegicus</i>)
PENELITI	: ANNISA WIDOWATI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 14 Maret 2018

Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 11. Analisa FTIR Cangkang Rajungan

